

Aus der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität

W ü r z b u r g

Vorstand: Professor Dr. med. H. S c h u e r m a n n

DER NACHWEIS GONADOTROPER HORMONE IM URIN UNTER
ANWENDUNG EIGENER TECHNISCHER MODIFIKATIONEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Hans-Joachim Schirow
aus Magdeburg

LANE MEDICAL LIBRARY
SAN FRANCISCO

Würzburg 1958

Aus der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität
W ü r z b u r g
Vorstand: Professor Dr. med. H. S c h u e r m a n n

DER NACHWEIS GONADOTROPER HORMONE IM URIN UNTER
ANWENDUNG EIGENER TECHNISCHER MODIFIKATIONEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Hans-Joachim Schirow
aus Magdeburg

Würzburg 1958

Referent: Professor Dr. med. H. Schuermann

Tag der Promotion:

24. 2. 58

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

**Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153517_0093

Ermittelte Mäuse-Einheiten nach:

Pat.Nr. Klin. T.u.W. Eig.Mod.

Anamnestiche und
diagnostische Hinweise

36	52,8	54	24	Aspermie, früher Go., Tubuli normal, Ver- schluß der ableitenden Samenwege auf Grund einer Go.
37	212	216	216	Hypogonadismus, hypergo- nadotroper, schwere Parenchymschädigungen unbekannter Genese.
38	106	108	108	Kinderlos verh., Testes von weicher Konsistenz, rechter Hoden verkleinert, Parenchymbild wenig ver- ändert, Fertilitätsstörung unbekannter Genese.
39	106	108	108	Verh., kinderlos, hoch- gradige Oligospermie, Tubulusschädigung mit interstitieller Zellver- mehrung.
40	106	108	108	Azoospermie, weiche Kon- sistenz des Hoden, Hoden- Th. röntgenbestrahlt.
41	3,3	3	3	16 J., geistig zurück- geblieben, Hodenatrophie doppelseitig, fehlende Schambehaarung, körperlich unterentwickelt.
42	3,3	3	3	16 J., Zwillings, geistig zurückgeblieben, Hoden- atrophie doppelseitig, fehlende Schambehaarung, körperlich unterentwickelt.
43	3,3	3	3	40 J., kinderlos verh., Stammfettsucht, geringe Sekundärbehaarung, Tubu- lusdegeneration, Verdacht auf Hypophysen- schaden.

suchungen in den folgenden Jahren ausreichend geklärt (Lyons u. Catchpole, Riddle, Bates u. Dykshorn, MacShan u. Meyer, Lyons, White, Bonnes u. Long, White, Folley u. Malpress). Das LMTH wird meist aus Schafs- und Ochsenhypophysen gewonnen, die einen besonders hohen LMTH-Gehalt aufweisen (Bates u. Riddle, Chance, Rowland u. Young). Die Einheitlichkeit der Substanz wurde durch Prüfung mit physikalisch-chemischen Methoden, durch Prüfung der Dialysierbarkeit und der Löslichkeitsverhältnisse sichergestellt.

Mit Hilfe der Eiweißforschungsmethoden, der Elektrophorese, der Ultrazentrifugierung, der Dialyse, spezieller Reaktionen wie der Biuret-, der Xanthoprotein-, der Ninhydrin-Reaktion und der Millonschen Probe, konnte sichergestellt werden, daß die gonadotropen Hormone zur Klasse der Proteohormone gehören. Da aber neben dem Eiweißanteil ein bestimmter Prozentsatz von Hexosen und Aminohexosen nachweisbar ist, der für die biologische Wirksamkeit unerläßlich erscheint und dessen Entfernung nur unter Zerstörung des Moleküls gelingt, kann man sie den Glykoproteiden zurechnen. Die einzige Ausnahme bildet der luteotrope Faktor, der keine Hexose- oder Aminohexoseanteile im Molekül enthält (Fraenkel - Conrat, Li sowie Li, Lyons u. Evans).

BIOLOGISCHE HERKUNFT UND WIRKSAMKEIT BEIM MENSCHEN, INSBESONDERE BEIM MANNE

Der menschliche Hoden hat eine doppelte Funktion:
In den Tubuli contorti werden die lebenden und befruchtungsfähigen Samenzellen gebildet, während in den Leydigzellen, soweit uns heute bekannt ist, die spezifischen

DER NACHWEIS
GONADOTROPER HORMONE
IM URIN UNTER ANWENDUNG EIGENER
TECHNISCHER MODIFIKATIONEN

DIE GONADOTROPEN HORMONE
DES HYPOPHYSENVORDERLAPPENS

ENTDECKUNG UND DARSTELLUNG IN HISTORISCHER SICHT

In den letzten Jahren hat die Diagnostik der Keimdrüsen-erkrankungen des Mannes durch die Hodenbiopsie und die quantitative Bestimmung der Gonadotropine des Hypophysenvorderlappens aus dem Urin einen bedeutenden Fortschritt erfahren. Da beim Manne die Gonadotropine extrahypophysären Ursprungs nicht vorkommen, sollen hier nur die Gonadotropine des Hypophysenvorderlappens und ihre Bedeutung für die Diagnostik männlicher Keimdrüsenenerkrankungen besprochen werden. Dieses Prinzip hypophysärer Gonadotropine kann seiner Wirkung nach in drei Faktoren aufgegliedert werden:

1. Follikel-stimulierendes Hormon (FSH);
Synonyme: Prolan A, Thylakentrin.
2. Interstitialzellen-stimulierendes Hormon (ICSH) oder auch luteinisierendes Hormon (LH);
Synonyme: Prolan B, Metakentrin.
3. Luteo-mammotropes Hormon (LMTH) oder luteotropisches Hormon (LTH);
Synonyme: Prolactin, Mammotropin, Luteotropin, lactogenes Hormon.

Diese drei Hormone können in den Hypophysen sämtlicher Craniaten nachgewiesen bzw. daraus gewonnen werden. Außerdem kommen sie beim Menschen in größeren Mengen im Menopausen- und Kastratenurin vor. Für die Diagnostik und Therapie der männlichen Keimdrüsenerkrankungen erlangten sie Bedeutung, seitdem man in der Lage war, die endokrine Steuerung durch quantitative Erfassung der im Urin ausgeschiedenen Gonadotropine zu beurteilen und dadurch den Sitz pathologischer Prozesse zu lokalisieren.

Obgleich man schon lange auf einen Zusammenhang von Hypophyse und Sexualdrüsen geschlossen hatte - schon 1910 fanden C u s h i n g sowie A s c h n e r an Hunden und 1930 S m i t h auch an Ratten, daß einer Exstirpation der Hypophyse bei jungen weiblichen Tieren eine Hemmung der geschlechtlichen Entwicklung folgte - führten doch erst die experimentellen Untersuchungen von Z o n d e k u. A s c h h e i m (1925) und unabhängig davon auch gleichzeitig von S m i t h zu bezeichnenden Ergebnissen.

Z o n d e k u. A s c h h e i m stellten nach Implantation von Teilchen des Rinderhypophysenvorderlappens in die Oberschenkelmuskulatur infantiler weiblicher Mäuse fest, daß diese nach 4 Tagen ebenso in Östrus gerieten wie nach Injektionen von Follikelhormon. Zusätzlich zeigten die Ovarien eine starke Vergrößerung, sog. Blutpunkte und Corpora lutea-Bildung. Da bei kastrierten Tieren eine analoge Wirkung nicht zu beobachten war, und somit offensichtlich der Effekt des im implantierten Hypophysenlappen enthaltenen Wirkstoffes nur über die Gonaden zustande kam, nannte ihn Z o n d e k "gonadotropes Hormon". Diese Hormone, die - ohne geschlechtsspezifisch zu sein - auf die Gonaden einwirken, werden heute allgemein als Gonadotropine bezeichnet.

Sehr bald bemühten sich zahlreiche Forscher um eine Reindarstellung des festgestellten Wirkstoffes aus dem Hypophysenvorderlappen. Es wurden die verschiedensten Extraktionsmethoden unter Heranziehung von alkalischen, sauren, wässrigen und Salz-Lösungen, sowie von Alkohol und Aceton versucht. Da es sich um ein Proteohormon handelte, standen einer Reindarstellung die bei der Isolierung reiner homogener Eiweißkörper bekannten Schwierigkeiten entgegen. Wiesner u. Marshall wiesen 1931 darauf hin, daß es sich bei dem aus dem HVL isolierten Gonadotropin um zwei getrennte Hormone handelt. Smith zeigte, daß Hypophysenimplantate vor allem Follikelreifung, jedoch wenig Luteinisierung bewirkten. Evans u. Simpson berichteten von stärkerer Luteinisierung bei alkalischer Extraktion als unter der Einwirkung von Säuren. Schließlich wurde die Herstellung eines in zwei Wirkstoffe zerlegten Hypophysenextraktes von Fevold, Hisaw u. Leonard mitgeteilt, die durch Fraktionierung ein follikelstimulierendes Hormon (FSH) und ein luteinisierendes Hormon (LH) aus dem Extrakt isolierten. Es dürfte sich jedoch damals nicht um eine Reindarstellung, sondern offensichtlich um jeweils mit dem einen oder anderen Wirkstoff stark angereicherte Gemische gehandelt haben.

Die Darstellung chemisch weitgehend gereinigten Hormons wurde dann von Fevold u. Mitarb., Fraenkel-Conrat u. Mitarb., Greep, van Dyke u. Chow, Chow sowie MacShan und Meyer beschrieben. Li u. Mitarb. gelang es 1949 erstmalig reines FSH darzustellen, das in Bezug auf spezielle Löslichkeitstests, Elektrophorese und Ultrazentrifugation sich als einheitlicher Stoff erwies und das frei von biologischen Nebenwirkungen war (Li, sowie Li und Pedersen, Li und Harris).

Die physikalisch-chemischen Daten für FSH nach L i und Mitarb. können nachfolgender Zusammenstellung entnommen werden:

Tab. I

Sedimentationskonstante		4,7	
Diffusionskonstante		$6,0 + 10^{-7}$	
Molekulargewicht		67000	
isoelektrischer Punkt		4,5	

Arginin	5,3 %	Lysin	11,1 %
Asparaginsäure	9,3 %	Methionin	1,0 %
Cystin	4,3 %	Phenylalanin	5,8 %
Glutaminsäure	13,4 %	Prolin	5,2 %
Histidin	3,7 %	Threonin	4,7 %
Isoleucin	3,3 %	Thyrosin	3,8 %
Leucin	9,2 %	Valin	5,8 %

Kohlehydratkomponenten			
Hexosen	1,2 %	Hexosamin	1,5 %

Die erstmalige Reindarstellung von ICSH gelang gleichzeitig und unabhängig voneinander aus der Schafshypophyse durch L i u. Mitarb. und aus der Schweinehypophyse durch S h e d l o w s k i u. Mitarb.

Ein laktogener Faktor war schon seit den Arbeiten von S t r i c k e r und G r u e t e r bekannt, doch wurde die Rolle, die er im Rahmen des gonadotropen Prinzips des HVL spielt, erst durch eine große Zahl von Unter-

suchungen in den folgenden Jahren ausreichend geklärt (Lyons u. Catchpole, Riddle, Bates u. Dykshorn, MacShan u. Meyer, Lyons, White, Bonnes u. Long, White, Folley u. Malpress). Das LMTH wird meist aus Schafs- und Ochsenhypophysen gewonnen, die einen besonders hohen LMTH-Gehalt aufweisen (Bates u. Riddle, Chance, Rowland u. Young). Die Einheitlichkeit der Substanz wurde durch Prüfung mit physikalisch-chemischen Methoden, durch Prüfung der Dialysierbarkeit und der Löslichkeitsverhältnisse sichergestellt.

Mit Hilfe der Eiweißforschungsmethoden, der Elektrophorese, der Ultrazentrifugierung, der Dialyse, spezieller Reaktionen wie der Biuret-, der Xanthoprotein-, der Ninhydrin-Reaktion und der Millonschen Probe, konnte sichergestellt werden, daß die gonadotropen Hormone zur Klasse der Proteohormone gehören. Da aber neben dem Eiweißanteil ein bestimmter Prozentsatz von Hexosen und Aminohexosen nachweisbar ist, der für die biologische Wirksamkeit unerläßlich erscheint und dessen Entfernung nur unter Zerstörung des Moleküls gelingt, kann man sie den Glykoproteiden zurechnen. Die einzige Ausnahme bildet der luteotrope Faktor, der keine Hexose- oder Aminohexoseanteile im Molekül enthält (Fraenkel - Conrat, Li sowie Li, Lyons u. Evans).

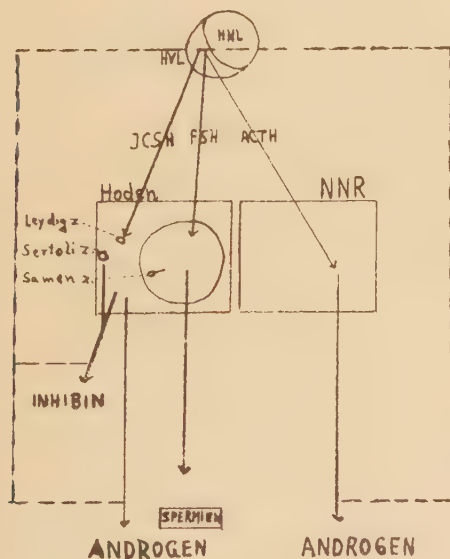
BIOLOGISCHE HERKUNFT UND WIRKSAMKEIT BEIM MENSCHEN, INSBESONDERE BEIM MANNE

Der menschliche Hoden hat eine doppelte Funktion: In den Tubuli contorti werden die lebenden und befruchtungsfähigen Samenzellen gebildet, während in den Leydigzellen, soweit uns heute bekannt ist, die spezifischen

männlichen Geschlechtshormone entstehen. Diese excretorischen und incretorischen Funktionen werden von der Hypophyse durch Ausschüttung von Gonadotropinen gesteuert, wobei das FSH einen speziellen Effekt auf die Spermiogenese besitzt, während der Aufbau des interstitiellen Gewebes und die Testosteronsynthese durch ICSH veranlaßt wird. Die Androgene ihrerseits sorgen für die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale. So wirken also die Gonadotropine des HVL nur über die Gonaden, und es muß als eine große Ausnahme angesehen werden, wenn ein gonadotroper Wirkstoff unmittelbar ohne Zwischenschaltung der Gonaden einen Einfluß auf die sekundären Geschlechtsmerkmale entfaltet. W i t s c h i konnte beim brasilianischen Weberfinken eine solche Ausnahme zeigen: Die Ausbildung des Hochzeitsgefieders ließ sich durch ICSH auch am kastrierten Tier auslösen. Die Regel bleibt aber doch, daß die Gonadotropine die geschlechtliche Entwicklung nur über die Gonaden auslösen. Ihre Sekretion wird beim Gesunden durch die Menge des erzeugten Testosterons und seine Rückwirkungen (M a c - C u l l a g h u. Mitarb. und H o w a r d u. Mitarb. vermuten ein zweites X-Hormon oder Inhibin) auf die Gonadotropinsynthese im HVL in einem ständigen Gleichgewicht gehalten. Dieses Gleichgewicht wird empfindlich gestört, wenn an irgend einer Stelle dieses wohlausgewogenen Systems ein Ausfall entsteht. So steigt z.B. bei Kastration und damit ausfallender Testosteron-Erzeugung die Produktion von Gonadotropinen im HVL erheblich an, während bei gesteigerter endogener Testosteron-Ausschüttung die Gonadotropinsekretion eine Hemmung erfährt. Neben der humoralen Steuerung dieser beiden Drüsen gibt es allerdings noch eine nervöse Steuerung, in deren Rahmen die enge Wechselwirkung von Adeno-Hypophyse (N o w a k o w s k i) und hypophysennahen Teilen des Hypothalamus eine besondere Rolle spielt und die zur Aufrechterhaltung einer normalen

Keimdrüsentätigkeit für unentbehrlich gehalten werden muß (S p a t z). Ferner bestehen schließlich noch wichtige funktionelle Beziehungen zwischen Hoden und Nebenniere, die eine gleiche entwicklungsgeschichtliche Herkunft aufweisen. Ihre ursprüngliche Verwandtschaft zeigt sich besonders darin, daß die Nebenniere ebenfalls Hormone mit androgener Wirkung zu bilden vermag, die ihrerseits wieder Rückwirkungen auf die Gonadotropinproduktion haben, wie aus der folgenden schematischen Darstellung nach N e l s o n ersichtlich ist:

Abb. 1



Die unterbrochenen Linien kennzeichnen die hypophysenhemmende Wirkung der Androgene und des Inhibins. - Erklärung der Abkürzungen: HVL = Hypophysenvorderlappen; HHL = Hypophysenhinterlappen; NNR = Nebennierenrinde.

Das FSH entfaltet seine Wirkung grundsätzlich am germinativen Gewebe. Während es im weiblichen Organismus zur Follikelreifung und zum Anstieg des Ovarialgewichts führt, steht beim männlichen Geschlecht das Wachstum der Tubuli contorti und die Spermatogenese unter seinem fördernden Einfluß. Keinerlei Einfluß hat das FSH auf das interstitielle Gewebe, auch nicht auf die Testosteronsynthese, wie sich durch das unveränderte Verhalten von Samenblase und Prostata bei einer Zunahme der FSH-Produktion nachweisen läßt, die als accessorische Geschlechtsorgane auf eine Erhöhung des Testosteronspiegels als Folge einer FSH-Vermehrung reagieren würden (E v a n s und S i m p s o n , C h o w).

In jüngster Zeit konnten diese älteren Erkenntnisse, die mit noch weitgehend verunreinigten Extrakten gewonnen wurden, durch S i m p s o n , E v a n s und L i unter Verwendung reiner Hormonfraktionen bestätigt werden. L i konnte mit physikalisch-chemisch homogenem sowie biologisch reinem Hormonprotein beim weiblichen Geschlecht eine Follikelreifung bis zur Follikelcystenbildung und beim männlichen Geschlecht eine Spermatogenese bis zum Stadium der reifen Spermatozoen hervorrufen. Diese Untersuchungen wurden am hypophysektomierten Tier vorgenommen und dadurch der Einfluß der Hypophyse des Versuchstieres ausgeschaltet. Bei beiden Geschlechtern konnte keine Wirkung von FSH auf das interstitielle Gewebe beobachtet werden.

Demgegenüber wirkt das ICSH bei beiden Geschlechtern auf das Interstitialzellengewebe der Gonaden ein. Es setzt dessen Funktionen in Gang und führt zu Regeneration des Gewebes nach Hypophysektomien (W e r t h). Im Ovar kommt es unter seiner Mitwirkung zum Follikelsprung. Anschließend wird unter Einwirkung von ICSH aus den Granulosaresten das Corpus luteum gebildet, wodurch das Ovar eine

weitere Gewichtszunahme über das vom FSH verursachte Maß hinaus erfährt. ICSH löst gemeinsam mit FSH die Oestronbildung aus und läßt sie zu ihrem physiologischen Optimum ansteigen. Beim Manne stimuliert ICSH ebenfalls das Interstitialgewebe, schafft damit die Voraussetzung für die Testosteronsynthese und regt das Wachstum der Tubuli und der accessorischen Geschlechtsdrüsen an (W e r t h). Direkt im Anschluß an eine Hypophysectomie gegeben, soll ICSH sogar die Spermatogenese weiterhin in Gang halten können (S i m p s o n, L i u. E v a n s). Auch bei ICSH konnten L i u. Mitarb., P i n c u s u. T h i m a n n, E v a n s u. Mitarb., sowie S h e d l o w s k i u. Mitarb. diese schon älteren Erkenntnisse mit Reinpräparaten bestätigen, gleichzeitig aber bei diesen Reinpräparaten eine verschiedenartige Zusammensetzung und unterschiedlichen Wirkungsgrad zwischen ICSH vom Schaf und vom Schwein feststellen.

Tab. II

Physico-chemische Daten von Schafs- u. Schweine-ICSH
(Nach P i n c u s u. T h i m a n n)

Test	Schaf	Schwein
C	-	49,37 %
H	-	6,83 %
N	14,20 %	14,93 %
Molekulargewicht	40 000	100 000
Isoelektrischer Punkt, p_H	4,6	7,45
Sedimentationskonstante, $S \times 10^{13}$	3,6	5,4
Tyrosin	4,5 %	-
Tryptophan	1,0 %	3,8 %
Mannose	4,5 %	2,8 %
Hexosamin	5,8 %	2,2 %

Tab. III

Zusammensetzung von ICSH, ACTH, Prolactin u. Wachstumshormon.
(Nach E v a n s u. Mitarb.)

Gehalt in % an	ICSH		ACTH		Prolactin		Wachstums- hormon
	Schaf	Schwein	Schaf	Schwein	Schaf	Rind	Rind
C	-	49,37	46,35	50,64	50,72	51,50	46,35
H	-	6,83	5,89	6,23	6,63	6,92	7,07
N	14,20	14,93	15,65	15,47	15,86	16,50	15,65
S	-	-	2,30	2,33	1,79	2,00	1,30
Amino-N	-	-	-	-	0,74	-	0,76
Amido-N	-	-	-	-	1,40	-	1,20
Cystein	0,0	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cystin	-	-	7,19	-	3,11	3,4	2,25
Methionin	-	-	1,93	-	4,31	-	3,06
Tyrosin	4,5	-	-	-	4,53	5,7	4,30
Tryptophan	1,0	3,8	-	-	1,30	1,3	0,92
Glutamin- säure	-	-	-	-	12,30	-	13,40
Arginin	-	-	-	-	8,31	-	-
Mannose	4,5	2,8	0,0	-	0,0	-	0,0
Hexosamin	5,8	2,2	0,0	-	0,0	-	0,0

Im Ganzen gesehen zeigt sich also, daß sich FSH und ICSH in ihren Bereichen ergänzen müssen, um eine volle biologische Wirkung zu erreichen; sie wirken also synergistisch (W e r t h).

Auf eine Besprechung des LMTH als luteotroper und laktationsauslösender Faktor soll hier verzichtet werden, da seine biologischen Funktionen beim Manne bisher noch nicht ermittelt werden konnten.

ARTEN DER BESTIMMUNG GONADOTROPER HORMONE

METHODEN DER CHEMISCHEN DARSTELLUNG

Im Urin lassen sich von den Gonadotropinen vor allem FSH und ICSH nachweisen, die etwa im Verhältnis 2 : 1 bzw. 3 : 1 ausgeschieden werden. So wünschenswert die Möglichkeit einer selektiven Erfassung von FSH und ICSH für die Diagnostik mancher Krankheitsbilder wäre, so schwierig ist sie doch infolge des erforderlichen technischen Aufwandes im Rahmen routinemäßiger Laboratoriumsuntersuchungen durchzuführen. Im allgemeinen begnügt man sich mit der gemeinsamen Erfassung der Gonadotropine und wertet sie quantitativ im Sinne eines indirekten Stimulationseffektes am Uterus der infantilen Maus oder Ratte aus, dessen Gewichtszunahme eine Folge der gemeinsamen FSH- und ICSH-Wirkung und der damit ausgelösten Sekretion ovarieller Hormone gewertet wird. Da im Gegensatz zu dem erstmals von Z o n d e k und A s c h h e i m im Urin nachgewiesenen Choriongonadotropin das hypophysäre Gonadotropin nur in geringen Mengen zur Ausscheidung kommt, erfordert der biologische Nachweis zunächst eine Konzentrierung dieser Wirkstoffe aus größeren Urinmengen. Zu diesem Zwecke sind viele Verfahren angegeben worden, von denen die nachfolgend genannten die größte Verbreitung gefunden haben.

Alkoholfällung-Dialyse-Methode nach Klinefelter u. Mitarb.

K l i n e f e l t e r , A l b r i g h t u. G r i s - w o r l d modifizierten die Alkohol-Ätherfällungs-Methode nach Z o n d e k und A s c h h e i m durch ein Alkoholfällungs-Dialysier-Verfahren, bei dem folgendermaßen vorgegangen wird:

Als Ausgangsmaterial werden $\frac{3}{4}$ der 24^h -Urinmenge ver-

wendet. Soll der Urin über mehrere Tage bis zur Verarbeitung aufbewahrt bzw. verschickt werden, wird eine Konservierung mit 2 Gramm Sulfanilamid empfohlen. Falls der Urin alkalisch ist, wird er mit Eisessig angesäuert, bis es zu einer sauren Reaktion kommt. Zu je 100 g Urin wird 1 g NaCl zugegeben. Danach wird 95 %-iger Alkohol in der vierfachen Ausgangsmenge zugesetzt. Dieser Ansatz kommt 12 - 24 Stunden in den Kühlschrank. Während dieser Zeit kommt es zur Bildung eines Niederschlages, dessen Sedi-
mentierung abgewartet wird. Der überstehende Alkohol wird abgesaugt und der Niederschlag erstmals für 3 - 4 min (1500 Umdr./min) zentrifugiert. Das so erhaltene Zentrifugat wird nach Verwerfen der überstehenden Flüssigkeit mit 50 ccm Äthyläther resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Danach wird der Niederschlag im Exsiccator getrocknet und anschließend dreimal mit 10 - 15 ccm Aqua dest. extrahiert. Nach jedem Auswaschen wird 3 - 5 min zentrifugiert und die überstehende bräunliche Flüssigkeit in 50 ccm fassende Erlenmeyer-Kolben überführt. Diese Lösung läßt man dann durch die Wandung eines Cellophanbeutels 4 Stunden in fließendem Wasser dialysieren. Der nach der Dialysierung im Beutel verbliebene Rückstand wird erneut nach Hinzufügen von 0,1 g NaCl mit 4 Volumen 95 %-igem Alkohol präzipitiert. Diese Lösung verbleibt 12 Stunden, bzw. bis die überstehende Flüssigkeit klar geworden ist, im Kühlschrank. Nach Absaugen der überstehenden Flüssigkeit wird das Präzipitat mit 15 - 20 ccm absol. Äther gewaschen und über Nacht im Vakuum getrocknet. In dieser Form ist der Niederschlag stabil und kann bei Zimmertemperatur bis zur Verwendung aufgehoben werden. Am Tage vor dem Versuch wird der trockene Niederschlag sorgfältig in 12,5 ccm Aqua dest. suspendiert und über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen, bevor daraus die Verdünnungsreihen angefertigt werden. Die Verdünnungsreihe wird nach folgendem Schema vorgenommen:

Tab. IV

Menge der Stammlösung	Menge des Verdgs.-mittels	Bei positiver Reaktion: Anz. d. Mäuse-Einheiten
6,0 ccm	0 ccm Aqua dest.	6,6
3,0 "	3,0 " " "	13,2
2,0 "	4,0 " " "	26,4
1,0 "	5,0 " " "	52,8

Für zu erwartende erhöhte Gonadotropinwerte gibt K l i n e f e l t e r die folgende Methode an, bei der auf das Dialysierverfahren verzichtet wird: Aus einem zwischen 21⁰⁰ und 6⁰⁰ Uhr gesammelten Nachturin wird die für einen Zeitraum von 90 min geltende Durchschnittsmenge errechnet, dieses Volumen dann angesäuert und filtriert, falls es getrübt erscheint. Der so vorbehandelte Urin wird mit 8 Volumen 95 %-igem eiskühlten Alkohol in einem weiten Erlenmeyer-Kolben versetzt, in den Kühlschrank gestellt und die Klärung der überstehenden Flüssigkeit abgewartet. Nach Absaugen der überstehenden Flüssigkeit wird der Niederschlag in 50 ccm fassende Zentrifugengläser übertragen. Am Glas haftende Reste sind sorgfältig mit der abgesaugten Flüssigkeit auszuspülen, damit sie nicht verlorengehen. Nach nochmaligem Zentrifugieren wird der Niederschlag zweimal mit 15 ccm absol. Alkohol und einmal mit 15 ccm absol. Äther gewaschen. Die zweite Alkoholwaschung kann nach starkem Zentrifugieren noch eine Trübung enthalten, die aber nach Zusatz von wenigen Kubikzentimetern absol. Äther und nach langsamem Zentrifugieren verschwindet. Der erhaltene Niederschlag wird im Vakuum-Exsiccator über Nacht getrocknet. Das trockene Präparat ist stabil und kann bei Zimmertemperatur bis zum Versuch aufgehoben werden. Am Vortage des Versuches wird der trockene Niederschlag sorgfältig mit 15 ccm Aqua dest. gemischt und über Nacht im Kühlschrank belassen, bevor die Verdünnungen nach folgender Aufstellung hergestellt werden:

Tab. V

Menge der Stammlösung	Menge des Verdgs.-mittels	Bei positiver Reaktion: Anz. d. Mäuse-Einheiten
6,0 ccm	0,0 ccm Aqua dest.	96
3,0 "	3,0 " " "	192
2,0 "	4,0 " " "	288
1,5 "	4,5 " " "	384
1,2 "	4,8 " " "	480

Ultrafiltration nach v. Massenbach und v. Eickstedt

Von Massenbach und v. Eickstedt beschreiben eine auf den Arbeiten von Gorbman basierende Methodik der Ultrafiltration mit einem Hochdruckapparat und zugehörigen Ultracellafiltern der Fa. Sartorius Göttingen. Diese Ultracellafilter sind kolloidale Membranen, die schon von Zondek, Marshall sowie Bomskov als undurchlässig für Prolan beschrieben werden und die härter sind als die von Elford und Gorbman verwendeten. Der genannte Hochdruckapparat hat ein Fassungsvermögen von 250 ccm und besteht aus folgenden Einzelteilen:

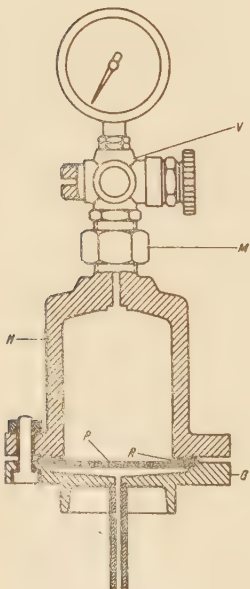


Abb. 2

Der Grundplatte (G), der Siebplatte (P), der Haube (H) und dem Ventilgehäuse (V).

Die zylindrische Haube hat einen Innendurchmesser von 9 cm. Zwischen Haube und Grundplatte wird ein Vul-

kanfiberring gelegt, der die Teile des zusammengesetzten Gefäßes vollkommen abdichten muß. Die filtrierende Membran liegt auf der Siebplatte des Apparates.

Ultracellafilter mit einer Durchlaufzeit von 400 bis 600 min zeigten sich geeignet zur filtrativen Trennung von Follikelhormon und gonadotropen Hormonen. Toxische Substanzen, die ebenso wie die gonadotropen Hormone aus dem Urin ausfallen, werden von diesen Filtern nicht zurückgehalten.

Im einzelnen gingen v. M a s s e n b a c h und v. E i c k s t e d t folgendermaßen vor:

Aus größeren Mengen von Urin wurden die gonadotropen Hormone zusammen mit anderen Substanzen mittels Äthylalkohol ausgefällt. Nach erneuter Lösung des Präzipitats in Aqua dest. wurden grobe Verunreinigungen durch Filtration entfernt und die so gereinigte Lösung dann durch ein Ultracellafilter gepreßt. Der auf dem Filter gebildete Rückstand läßt sich dann gut mit einem Pinsel in Aqua dest. lösen.

Zur Umgehung der kostspieligen Alkoholfällungsmethode wurden auch Versuche mit der Acetonfällung nach B r a z e l durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, daß sie mit geringeren Flüssigkeitsmengen durchgeführt wird und daß Aceton billiger ist als Alkohol, doch müssen dabei die zeitraubenden Arbeitsgänge der Acetonfällung in Kauf genommen werden. Um diesen Schwierigkeiten aus dem Wege zu gehen und doch Gonadotropine aus größeren Mengen von Urin anreichern zu können, erwähnen die Autoren Versuche mit einem Hochdruckapparat von 2 Litern Fassungsvermögen. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurde noch nicht berichtet.

Chromatographische Gonadotropingewinnung nach Taubert u. Weller

Aufbauend auf den Arbeiten von Katzman, Godfrid, Cain und Doisy, die zum erstenmal die Adsorptionschromatographie zur Darstellung und Gewinnung von Choriongonadotropin anwandten, und die auf die hypophysären Gonadotropine erweiterten Untersuchungen von Dekansky sowie Bradbury, Brown und Brown, die Kaolin als Adsorbens benutzten, und ferner Malburg und Goodman, die mit Aluminiumhydroxyd arbeiteten, entwickelten Taubert und Weller eine Methode der Gewinnung hypophysärer Gonadotropine durch die chromatographische Adsorption an Permutit. Dabei wurde folgende Methodik angewandt:

Zur Aufarbeitung gelangt die halbe 24^h -Urinmenge, die mittels Eisessig auf einen p_H -Wert von 4,0 eingestellt wird. Dieser Ansatz wird durch 60 cm lange Chromatographiesäulen geleitet, die eine lichte Weite von 1,2 cm haben und mit Permutit als Adsorbens gefüllt sind. Um einen kontinuierlichen Durchfluß zu gewährleisten, läßt man den Urinansatz aus Scheidetrichtern zufließen, wobei sich das Nachfließen durch Senken des Flüssigkeitsspiegels automatisch reguliert. Jede Säule hat eine Kapazität von 250 - 300 ccm Urin. Nach Passage des Urins wird das Permutit durch Anschluß der Säule an die Wasserstrahlpumpe getrocknet. Anschließend wird mit je 60 ccm 35%-igem unverg. Alkohol, der 10 % Ammonacetat enthält, jede Säule eluiert. Eine vorherige Waschung zur Entfernung toxischer Substanzen ist nicht mehr notwendig. Das Eluat wird in 250 ccm fassenden Zentrifugengläsern aufgefangen und die Gonadotropine durch Erhöhung der Alkoholkonzentration - man füllt die Zentrifugengläser mit 96 %-igem Äthylalkohol bis 250 ccm auf und beläßt sie 6 Stunden im Kühlschrank - ausgefällt. Durch anschließendes Zentrifugieren (für 3 min

bei 2500 - 3000 Umdr. pro Minute) haftet das Präzipitat fest am Glas und der Alkohol kann ohne Verlust abgegossen werden. Danach wird das Zentrifugat im Vakuum-exsiccator über Calciumchlorid getrocknet. Anschließend wird zur Entfernung der Oestrogene aus dem Präzipitat mit Äther gewaschen und nachfolgend dekantiert. Ein einstündiges Einbringen des gewaschenen Niederschlages in einen Exsiccator, der zusätzlich ein Glas konzentrierte Schwefelsäure enthält, führt dann zur vollständigen Trocknung. Der festhaftende Niederschlag wird mit einem Glasstab zu feinem Pulver zerrieben. In dieser Form ist das Präparat haltbar und kann bis zur Aufarbeitung so belassen werden. Am Tage vor dem Versuch wird das trockene Pulver mit einer der Zahl der Versuchstiere entsprechenden Menge Aqua dest. resuspendiert und im Kühlschrank bis zum Versuch aufgehoben.

VERFAHREN DER BIOLOGISCHEN ERFASSUNG

Der Forderung nach einfachen und unbedingt genauen Methoden der qualitativen wie quantitativen Erfassung der Gonadotropine aus dem Urin als sicheren diagnostischen Hilfsmitteln steht noch immer die Unsicherheit der bisher verwandten biologischen Tests gegenüber. Zwar wurde von C r o o k e , I n g r a m , B u t t und R o m a n s c h u c k auch eine Methode der chemischen Abtrennung und Bestimmung hypophysärer Gonadotropine mitgeteilt, bei der die Ergebnisse von Farbreaktionen (Ninhydrin auf Aminosäuren, Orcinol auf Hexosen) gemessen werden, doch sind bestätigende Untersuchungen über die Sicherheit dieser Methode bisher nicht bekannt geworden. Sollten sich allerdings die Angaben dieser Autoren auf breiterer Basis bestätigen lassen, so würde das eine wesentliche Vereinfachung und auch größere Genauigkeit der Gonadotropinbestimmung bedeuten als sie bisher bei der biologischen

Auswertung zu erwarten war. Bisher allerdings hat sich für die Routineuntersuchung allein der biologische Tierversuch als durchführbar erwiesen.

Der Nachweis im Tierversuch

Wie in vielen anderen Gebieten der Endokrinologie, so wurde auch zur Auswertung der Gonadotropine, dieser schwer erfaßbaren und biologisch hochaktiven Substanzen, der Tierversuch herangezogen. Auf der Suche nach geeigneten Testtieren zur Auswertung der Gonadotropinmengen wurden Versuche mit Hunden, Affen, Ratten, Kröten, weißen Mäusen, Regenwürmern, Vögeln, Tauben, Kaninchen, Meerschweinchen und vielen weiteren Tieren gemacht (Cushing, Aschner, Galli-Mainini, Dahlberg, Hasenbein, Pfeiffer sowie Zondek und Ascheim, Bedoia u. Mortis, Aaron, Aaron, Marescaux u. Petrovich, Riddle, Bates u. Dykshorn, Lyons u. Catchpole, Lyons u. Page, Li u. Evans, Greep, van Dyke u. Chow, Hartmann u. Speert, Witchi).

Praktische Bedeutung für die klinischen Untersuchungsmethoden konnten jedoch nur die Versuche mit Ratten und Mäusen erlangen. Wegen des technischen Aufwandes blieben Ratten aber hauptsächlich wissenschaftlichen Arbeiten vorbehalten, während für Routineuntersuchungen Mäuse verwandt wurden. Für wissenschaftliche Zwecke kommen im Durchschnitt infantile hypophysektomierte Ratten im Alter von etwa 24 Tagen und einem Durchschnittsgewicht von 35 - 40 g zur Verwendung. Für die Routinearbeit haben sich in-

fantile weibliche weiße japanische Springmäuse mit einem Alter von 17 - 21 Tagen und einem Durchschnittsgewicht von etwa 10 g als zweckmäßig erwiesen.

Zur Bestimmung des Gonadotropingehaltes eines Präparates werden die Veränderungen der Follikel, der Ovarien, der Uteri oder der Vesikulardrüsen eines Versuchstieres auf bestimmte verabreichte Dosen in Vergleich gesetzt zu einem Kontrolltier der gleichen Art bei gleichem Alter und Gewicht. Neben der Schwierigkeit, genau gleichaltrige Tiere zum Versuch zu erhalten, kommt hier schon eine ganze Reihe von Schwierigkeiten und Fehlerquellen zum Vorschein. Abgesehen von dem unterschiedlichen Entwicklungsgrad haben die verschiedenartigsten Umstände einen Einfluß auf die Reagibilität der Tiere. So wirken neben der an und für sich sehr unterschiedlichen Reaktionsstärke der verschiedenen Tierstämme (W e r t h) nachhaltige Stress-Situationen wie Hunger oder Kälte (T a u b e r t) sich störend auf die Versuchsergebnisse aus, die natürlich je nach der verwandten Methode auch unterschiedliche Ergebnisse zeitigen können (N o w a k o w s k i). Es können deshalb vergleichende Untersuchungen über die Erfahrungen und Ergebnisse der verschiedenen Autoren nur sehr bedingt zu Schlußfolgerungen herangezogen werden.

Die Möglichkeiten einer qualitativen und quantitativen Auswertung

Für die Diagnostik der Keimdrüsenerkrankungen ist es wichtig, die Ausscheidung der Hormone nicht nur qualitativ sondern in besonderem Maße auch quantitativ zu erfassen. Für die quantitative Bestimmung von FSH und ICSH werden die verschiedenartigsten Methoden angegeben:

E v a n s, S i m p s o n, T o l k s d o r f und J e n s e n beschreiben eine Testierung von FSH durch

histologisch kontrollierte Follikelreifung. Hypophys-ektomierte Ratten erhalten dabei täglich eine Injektion der zu untersuchenden Urin- (Hormon-) Zubereitung subkutan. Eine Ratten-Einheit ist dann die Hormonmenge, die innerhalb von 72^h zu histologisch sichergestellter Ausbildung normaler Follikel führt. Man kann bei dieser Methode sogar gleichzeitig Beimengungen von ICSH am Zustand des Interstitialgewebes feststellen.

Eine andere Methode nimmt die Zunahme des Ovarialgewichtes unter bestimmten FSH-Dosen kombiniert mit bekannten Mengen von Choriongonadotropin als Maßfaktor (S t e e l m a n u. P o h l e y). Infantile Ratten erhalten dabei täglich eine Injektion subkutan der zu testenden Hormonaufbereitung kombiniert mit einer genau bekannten Menge Choriongonadotropin. Eine Ratteneinheit wird dann definiert als die Dosis FSH, die die Wirkung des Choriongonadotropin auf das Ovar um 100 % verstärkt (synergistischer Effekt).

Als indirekte Methoden werden die Testierung am Scheidenabstrich (Z o n d e k) und am Uterusgewicht (L e v i n u. T y n d a l e) angegeben. Eine Mäuseeinheit FSH ist beim Scheidenabstrich die Dosis der Testlösung, die nach 6 Injektionen in 3 Tagen bei wenigstens 3 von 6 Mäusen die Brunst - kenntlich am Schollenstadium - auslöst. Bei der Ratte soll bei gleichem Test eine Ratteneinheit etwa 3 Mäuseeinheiten entsprechen (A n s e l m i n o u. H o f f m a n n). Eine Mäuse-Uterus-Einheit (ME) ist diejenige Hormonmenge, die an infantilen Mäusen bei täglich einer Injektion innerhalb 72^h eine Zunahme des Uterusgewichtes um 100 - 150 % erzeugt.

Ebenso werden für ICSH mehrere Methoden beschrieben. S i m p s o n, E v a n s und L i testen den Einfluß von ICSH auf das Kernchromatingerüst der Intersti-

tialzellen und deren Rückbildungsformen nach Hypophys-ektomie. Dabei wird für ICSH eine Einheit als die Hor-mondosis definiert, die bei hypophysektomierten Ratten nach täglich intraperitonealer Injektion innerhalb von 72^h zu deutlicher Reaktion am Chromatingerüst der Inter-stitiazellenkerne führt. Nach F e v o l d werden hypophysektomierten Ratten in 5 Tagen täglich 2 Ratten-Einheiten (RE) FSH zusammen mit dem Testpräparat subku-tan injiziert. Eine Ratten-Einheit ICSH ist dann die Dosis, die die von FSH allein verursachte Gewichtszu-nahme um 100 % ansteigen läßt. Um die vorbereitende Be-handlung mit FSH vermeiden zu können, benutzt F e v o l d eine Methode, die auf der Gewichtszunahme der Vesikular-drüsen unter ICSH-Einfluß basiert. Eine Ratten-Einheit ist danach die kleinste Hormonmenge, die nach zweimaliger täglicher Injektion innerhalb 5 Tagen zu einer Verdoppe-lung des Vesikulardrüsengewichtes führt, doch sollen auf diesen Test verschiedene Rattenstämme sehr unterschiedlich reagieren (F e v o l d).

Alle diese Tests, die auf eine getrennte Bestimmung von FSH und ICSH abgestellt sind, lassen sich - wie schon er-wähnt - in der routinemäßigen Laboratoriumsarbeit kaum verwenden, da ihre Anwendung an komplizierte technische Voraussetzungen gebunden ist. Um den Erfordernissen der Routineuntersuchung zu entsprechen, entwickelten K l i n e f e l t e r, A l b r i g h t u. G r i s - w o r l d einen Test am infantilen Mäuseuterus, der auf der gemeinsamen Wirkung von FSH und ICSH beruht. Je zwei Mäuse von 6 - 10 g und einem Alter von 17 - 21 Tagen wer-den für die zu untersuchende Hormonaufbereitung verwendet. Zweimal am ersten, zweimal am zweiten und einmal am dritten Tag werden 0,5 ccm der Verdünnung subkutan injiziert. Am vierten Tage werden die Mäuse durch Leuchtgas getötet. Der freipräparierte und zwischen Filterpapier ...

Uterus muß 7 mg oder mehr wiegen, um als positive Reaktion zu gelten. Gewogen wird aber nur, wenn eine Vergrößerung des Uterus gegenüber dem eines Kontrolltieres nicht einwandfrei zu erkennen ist.

GEGENÜBERSTELLUNG DER METHODEN UND IHRER DIAGNOSTISCHEN BEDEUTUNG BISHERIGE ERFAHRUNGEN MIT DEN VERSCHIEDENEN METHODEN

Bei einer Gegenüberstellung der angegebenen Methoden der Gonadotropingewinnung interessieren vor allem die Empfindlichkeit, Genauigkeit und Schnelligkeit sowie Wirtschaftlichkeit dieser Verfahren. Da diese Faktoren mehr oder minder voneinander abhängig sind, ist es schwer, einer Methode den Vorrang zu geben. Im folgenden Abschnitt soll deshalb versucht werden, die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden aufzuzeigen.

Die Leistungsfähigkeit ist bei allen Methoden etwa gleich, da sämtliche Methoden in der routinemäßigen Untersuchung angewandt werden können und auch größeren Untersuchungsreihen gewachsen sind. Absolut sichere Vergleiche über die Genauigkeit der verschiedenen Methoden lassen sich aus den Angaben der Autoren oder anderer Untersucher nicht ableiten, da sich einerseits die Ausgangsmaterialien und andererseits die Testbedingungen unterscheiden.

T a u b e r t und W e l l e r geben die Hormonausbeute bei der Adsorptionschromatographie um 15 - 25 % höher an als bei der Alkoholfällung - Dialysemethode. Die Verlustrate wird auf Grund von Versuchen mit bekannten Mengen Equoman (Stutenserum-Gonadotropin der Fa. M a c k, Illertissen) - verwendet wurden Untersuchungslösungen von

5 - 30 IE in 300 ccm Kinderharn - mit 10 - 15 % ange-
geben. Da v. M a s s e n b a c h u. v. E i k-
s t e d t in ihrer Arbeit berichten, daß sich nach
Ultrafiltration im Filtrat keinerlei Gonadotropine mehr
nachweisen ließen, die Ausfällung mit Alkohol aber prak-
tisch die gleiche ist wie bei der Alkoholfällung - Dia-
lyse-methode, kann wohl auf die gleiche Ausbeute an Gona-
dotropinen geschlossen werden wie bei der genannten Me-
thode, wenn diese nicht sogar höher ausfällt, da der Ver-
lustanteil bei den weiteren Arbeitsgängen der Methode
von K l i n e f e l t e r u. Mitarb. nicht bekannt
ist.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß die Genauig-
keit bei der Adsorptionschromatographie und der Ultra-
filtration etwas besser ist als bei der Alkoholfällung-
Dialyse-Methode. Die Zeitersparnis bei der Durchführung
der verschiedenen Arbeitsgänge erscheint bei der Adsorp-
tionschromatographie am größten, was sich allerdings,
wenn größere Hochdruckapparaturen verwendet werden könnten,
nicht mehr unbedingt sagen ließe. Da in den wenigsten
Laboratorien eine solche kostspielige Apparatur zur Ver-
fügung stehen dürfte, kann die Adsorptionschromatographie,
zumal sie mit weitaus geringeren Mengen an Alkohol arbei-
tet als die Alkoholfällung-Dialyse-Methode, als die wirt-
schaftlichste Methode zur Gewinnung von Gonadotropinen
angesehen werden.

BISHERIGE MÖGLICHKEITEN DER DIAGNOSTISCHEN AUSWERTUNG IN QUALITATIVER UND QUANTITATIVER HINSICHT

Um aus dem Ergebnis der Gonadotropinbestimmung Rückschlüsse
auf ein pathologisches Geschehen im Organismus ziehen zu
können, ist es vorerst wichtig, die Normalausscheidungswerte
des gesunden Menschen zu kennen. Hier sind die Angaben der

verschiedenen Autoren mit geringen unwesentlichen Ausnahmen kaum voneinander verschieden. K l i n e f e l t e r gibt die Gonadotropinausscheidung beim normalen Individuum mit 6,6 - 53 ME für den Mann und mit 6,6 bis weniger als 53 ME bei der Frau an. T a u b e r t gibt bei Kindern zwischen 11 und 13 Jahren eine Ausscheidung von 2 - 3 ME, bei Männern von 20 - 40 ME und bei Frauen im ersten und letzten Drittel des Zyklus von 4 - 8 ME an, während er bei Frauen im mittleren Drittel des Zyklus 20 - 40 ME als normal ansieht. N o w a k o w s k i, V i n k e, C r o o k e, W e r t h und andere Autoren geben etwa die gleichen Werte für den normalen Menschen an. Somit sind also beim Erwachsenen Werte unter 6 ME und über 53 ME als unbedingt pathologisch anzusehen. Für die Beurteilung verringerter Gonadotropinausscheidungen eignen sich die Alkoholfällung - Dialyse - Methode und die Ultrafiltration, während die Nicht-Dialyse-Methode speziell zur Verarbeitung höherer Gonadotropinkonzentrationen entwickelt worden ist. Die Adsorptionschromatographie läßt sich für beide Fälle gleich gut anwenden. Eine erhöhte oder verringerte Gonadotropinausscheidung läßt wesentliche Rückschlüsse auf den Sitz und die Ursache einer Keimdrüsenkrankung zu.

Während die primären Hodenerkrankungen stets erhöhte Gonadotropinwerte zeigen, lassen erniedrigte Gonadotropinwerte auf eine sekundäre Hodeninsuffizienz schließen. Die Sicherstellung der Diagnose kann natürlich nicht ohne Beachtung des äußeren Habitus und der pathohistologischen und palporischen Untersuchungsmethoden geschehen. So kann die primäre Hodeninsuffizienz sehr verschiedene Ursachen haben. Es kann eine kongenitale Anorchie vorliegen, ein Zustand, der aber sehr mit Vorsicht zu diagnostizieren ist, da sich ein Abdominalhoden nicht immer mit Sicherheit ausschließen läßt. Es wird angenommen, daß die in diesem Milieu höhere

Temperatur zu einer Störung der Hodenentwicklung wie auch seiner Funktion führt. Weit häufiger sind angeborene Störungen der Hodenentwicklung, die zu bindegewebig verhärteten und rudimentären Testikeln führen. Auf Grund völliger Funktionslosigkeit entsteht dann Früheunuchoidismus oder "funktionelle präpuberale Kastration" (H e l l e r u. N e l s o n). Kryptorchismus führt bei doppelseitig ausgebliebenem Descensus stets zu Sterilität und Störung der inkretorischen Funktionen. Während die Pubertät meist noch normal verläuft, werden bei älteren Kryptorchiden die inkretorischen Schädigungen stets offenbar. Pathohistologisch tritt bei Fortgeschrittenen neben der Degeneration auch Proliferation der Leydigzellen auf, wodurch das Bild der primären Hodenatrophie eindeutig bestimmt wird (N o w a k o w s k i).

Auch das Klinefelter-Syndrom fällt unter die primären Hodenerkrankungen. Sie ist nach K l i n e f e l t e r u. Mitarb. eine isolierte Erkrankung der Tubuli, die mit doppelseitiger Hodenatrophie, Azoospermie, Gynäkomastie und erhöhter Gonadotropinausscheidung einhergeht. Die Zwischenzellfunktionen sollen dabei erhalten bleiben. H e l l e r u. N e l s o n konnten feststellen, daß hormonelle Ausfallserscheinungen nicht selten sind. N o w a k o w s k i will allerdings das Klinefelter-Syndrom nicht als gesondertes Krankheitsbild betrachtet wissen, da die Kardinalsymptome praktisch auf jede primäre Hodenatrophie zutreffen. Weiterhin gehören zu den primären Hodenschädigungen die exogenen Atrophien bekannter wie unbekannter Ursache. Hierher gehören Strahlenschädigungen, Ausfälle durch Infekte oder Entzündungen oder extreme Hungersituationen. Inkretorische Ausfallserscheinungen treten in diesen Fällen allerdings meist erst in den späten Stadien auf, da der Hoden seine inkretorische Funktion sehr lange aufrecht erhält. Das klinische

Bild hängt demnach also sehr vom Ausmaß des pathologischen Hodenprozesses ab. Abschließend kann also gesagt werden, daß es sich bei den primären Hodenerkrankungen um eine gut abzugrenzende Krankheitsgruppe handelt, die sich von den sekundären Krankheitsbildern vor allem durch erhöhte Gonadotropinausscheidung und bestimmte morphologische Befunde am Hoden abgrenzen läßt. Ätiologisch spielen bei einem Teil kongenitale Faktoren, bei den primären Atrophien vor allem exogene Schädigungen der Testikel die Hauptrolle. Hormonale Ursachen waren bisher praktisch nie nachweisbar (N o w a k o w s k i).

Bei den sekundären Krankheitsbildern sind grundsätzlich zu unterscheiden die hypophysärer Genese und die nervaler Genese. Zu den ersteren gehören einerseits der Ausfall der gonadotropen Funktionen der Hypophyse ohne Versagen anderer hormoneller Funktionen, andererseits aber auch der Ausfall anderer Funktionen durch organische Erkrankungen und ausgedehnte Destruktion der Hypophyse.

Bei Eunuchoidismus schafft nur die Gonadotropinbestimmung Klarheit über die primäre oder sekundäre Herkunft der Insuffizienz. Nur bei Fehlen gonadotroper Hormone und wenn andere Schädigungen nicht nachweisbar sind kann ein spezielles Versagen der gonadotropen Funktionen der Hypophyse oder der sogenannte Idiopathische Eunuchoidismus angenommen werden. Isolierte Störungen der Gonadotropinbildung finden sich auch bei Hämochromatose, wenn Eisen in großen Mengen in den basophilen Hypophysenzellen abgelagert wird. Es handelt sich also dann auch um einen Ausfall sekundärer Natur (N o w a k o w s k i).

Überfunktionszustände der Nebennierenrinde, die meist auf Hyperplasien oder Tumoren der NNR zurückzuführen sind, lassen meist auch Reifungsstörungen der Testikel erken-

nen. Trotz gleichartiger histologischer Befunde und Fehlen gonadotroper Hormone liegt der wichtigste Unterschied zum Idiopathischen Eunuchoidismus im völligen Fehlen eunuchoider Symptome. Es besteht im Gegenteil eine gesteigerte endogene Androgenproduktion, die einen echten Hypervirilismus mit erhöhter 17 - Keto - Steroid - Ausscheidung hervorruft. Das pathohistologische Bild der sekundären Hodenatrophie zeigt schwerste degenerative Veränderungen der Kanälchenwände und im Gegensatz zu den primären Veränderungen hier völliges Fehlen der Zwischenzellwucherungen.

Zu den Ursachen sekundärer Hodenatrophien nervaler Genese gehören Läsionen im Bereich hypophysennaher Teile des Hypothalamus wie auch Querschnittsläsionen des Rückenmarks. Bei Querschnittsläsionen mit doppelter Hodenatrophie ist meist kein gonadotropes Hormon nachweisbar.

Schwere seelische Traumen sollen Rückbildungen des Keimepithels, ja sogar in einzelnen Fällen Hodenatrophien zur Folge geben können (S t i e v e). Durch psychische Traumen bedingte Hodenveränderungen sollen allerdings stets reversible Geschehen sein, deren Normalisierung in kürzester Zeit bei Fortfall des exogenen Einflusses eintritt (B e l o n o s c h k i n).

N o w a k o w s k i stellt diese verschiedenartigen Erkrankungen nach Über- oder Unterfunktion der hormonellen Steuerung in großen Gruppen wie folgt zusammen:

Tab. VI

Primäre Hodeninsuffizienz
(Hypergonadotroper Hypogonadismus)

a) Anorchien

angeboren:	Agenesien
erworben :	Kastration

b) Aplasien der Testikel

"funktionelle präpuberale Kastration"
(nach Heller u. Nelson)

c) Hodendystopien

(z.B. Kryptorchismus)

d) Klinefelter-Syndrome

e) Exogen bedingte Hodenschädigungen
(Trauma, Entzündung, etc.)

} Primäre Hoden-
atrophien

Sekundäre Hodeninsuffizienz
(Hypogonadotroper Hypogonadismus)

A. Hypophysärer Genese

1. Isolierte Störungen der gonadotropen
HVL-Funktion

a) Idiopathischer Eunuchoidismus
(Mangel an FSH bzw. ICSH)

b) Hämochromatose

c) Hodeninsuffizienz bei Überfunktions-
zuständen der NNR
(Androgenitales u. Cushing-Syndrom)

2. Organische Erkrankungen der intrasellären
Hypophyse

B. Nervaler Genese

(Erkrankungen des Hypothalamus, Quer-
schnittläsionen des Rückenmarks,
Sympathektomien etc.)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

Wie aus dem vorhergehend Berichteten hervorgeht, hat die quantitative Bestimmung der Gonadotropine aus dem Harn für die Diagnostik der Keimdrüsenenerkrankungen heute eine nicht mehr aus der Reihe der klinischen Untersuchungsmethoden wegzudenkende Funktion übernommen. Es dürfte deshalb für die klinische Routinearbeit wünschenswert erscheinen, diese Methoden technisch zu vereinfachen und wenn möglich ihre Genauigkeit zu verbessern. Diese Gründe veranlaßten die eigenen Untersuchungen mit dem Ziel, für die bekannten Methoden Wege der Verbesserung zu suchen.

Da eine Hochdruckapparatur nicht zur Verfügung stand und wohl auch die wenigsten Laboratorien in Besitz eines solchen Gerätes sein dürften, schied die Methode nach v. M a s s e n b a c h und v. E i c k s t e d t für unsere Versuche von vorneherin aus, zumal auch die neuere Methode der Adsorptionschromatographie mit geringerem Aufwand eine gleichwertige Erfassung der Gonadotropine versprach. Es wurden daher die positiven wie auch die negativen Eigenschaften der schon allgemein bekannten Alkoholfällung-Dialyse-Methode nach K l i n e f e l t e r u. Mitarb. sowie der neueren Adsorptionschromatographie nach T a u b e r t u. W e l l e r einer vergleichenden Untersuchung unterzogen.

Als Untersuchungs- und Testmaterial dienten Urine von Männern zwischen 25 und 35 Jahren. Um ein gleichwertiges Ausgangsmaterial für die Vergleichsuntersuchungen zu besitzen, wurden jeweils 2 - 3 24^h -Urinmengen des gleichen Probanden gemischt und nach Filtration der trübenden Beimengungen entsprechend der Anzahl der verwendeten 24^h -Urinmengen zu gleichen Teilen wieder aufgeteilt.

VORVERSUCHE UND MODIFIKATIONEN UND IHRE JEWEILIGEN ERGEBNISSE

Vergleichende Untersuchungen der Methoden nach Taubert - Weller sowie Klinefelter u. Mitarb.

Um die Empfindlichkeit der beiden Methoden gegeneinander abzuwägen, wurden je 20 der 24^h-Urine unter genauer Befolgung der von den genannten Autoren angegebenen Methoden verarbeitet. Um die ermittelten Werte jeder Methode miteinander vergleichen zu können, wurde das Gesamtergebnis in Durchschnittsprozentzahlen angegeben, da aus schon einmal erwähnten Schwierigkeiten heraus (verschiedener Verdünnungsmodus, Schwankungsbreite der Methoden, unterschiedliche Reaktion der Tiere) die direkte Gegenüberstellungen der Einzelwerte nicht immer einen abwägenden Vergleich ermöglicht. Die Ergebnisse der Versuchsreihen wurden also jeweils zusammengezählt und der Methode, die die höchsten Werte in ermittelten Mäuseeinheiten erreichte, der Wert 100 gegeben. Die Ergebnisse der anderen Methoden wurden dann in Prozenten der ersten Methode ausgedrückt.

Auf diese Weise, wie die nachfolgende Tabelle zeigt, ergaben sich bei der Methode nach Taubert - Weller in der Regel höhere Werte als bei der Methode nach Klinefelter u. Mitarb. Die in einigen Fällen höheren Werte der Methode nach Klinefelter dürften in der Unterschiedlichkeit der Verdünnungsreihen begründet sein. Im Durchschnitt ergab sich eine um 12 % geringere Ausbeute an Gonadotropinen bei der Alkoholfällung-Analyse-Methode gegenüber der Adsorptionsschromatographie. Dieses dürfte mit den von Taubert - Weller angegebenen Werten übereinstimmen. Es ergab sich also in der Tat

neben dem geringeren technischen Aufwand der Adsorptionschromatographie eine doch wesentlich genauere Erfassung der Gonadotropine:

Tab. VII

Versuchsurin-Nr.	Ermittelte Mäuse-Einheiten	
	nach T. - W.	nach Klin.
1.	18	13,2
2.	18	19,8
3.	24	19,8
4.	12	13,2
5.	24	19,8
6.	12	6,6
7.	18	19,8
8.	24	26,4
9.	12	13,2
10.	24	19,8
11.	18	13,2
12.	18	13,2
13.	12	6,6
14.	18	19,8
15.	12	6,6
16.	24	26,4
17.	18	19,8
18.	24	19,8
19.	12	6,6
20.	18	13,2
Summarische Auswertung		
Gesamtzahlen:	360	316,8
Empfindlichkeit in %:	100 %	88 %

Untersuchungen über die Brauchbarkeit der Adsorptionschromatographie bei extrem hohen Gonadotropinkonzentrationen

Um auch größeren Gonadotropinwerten gegenüber die Leistungsfähigkeit der Adsorptionschromatographie nachweisen zu können, wurden ferner Verdünnungen von Schwangerenurinen nach den beiden zuvor genannten Methoden untersucht. Diese Urine wurden durch Filtration von trübenden Beimengungen befreit. Da die zu erwartenden Werte, die nach Angabe verschiedener Autoren bei Schwangeren in der Norm zwischen 5000 und 15000 Mäuseeinheiten liegen mußten, weit über das Maß der bei pathologischen Hodenprozessen anfallenden und mit der Adsorptionschromatographie darzustellenden Gonadotropinmengen hinausgehen mußten, wurde eine 25%-ige Verdünnung der Schwangerenurine mittels Aqua dest. vorgenommen. Die in dieser Verdünnung noch immer zu erwartenden Gonadotropinwerte von über 1000 MU. wurden als ausreichend angesehen, um die Verarbeitungsbreite der Adsorptionschromatographie zu demonstrieren. Verdünnungen von 10 Schwangerenurinen wurden auf diese Weise zu Untersuchungen herangezogen.

Für die biologische Auswertung wurden weiße weibliche Mäuse in einem Alter von etwa 17-21 Tagen und einem Gewicht von durchschnittlich 8-10 Gramm verwendet. Diesen Tieren wurde in den ersten 2 Tagen je zweimal und am dritten Tag einmal 0,5 ccm der zu untersuchenden Verdünnungen injiziert. Am folgenden Tage wurden diese Tiere dann durch Leuchtgas getötet und die Größe der Uteri in Vergleich zu denen von Kontrolltieren gesetzt.

Diese Untersuchungen erwiesen die Brauchbarkeit der Adsorptionschromatographie auch bei höheren Gonadotropinwerten. Die Tests, die bei 12 vorbehandelten Schwangerenurinen (bis zu 1000 MU) durchgeführt wurden, zeigten durchweg bei diesen sehr hohen Konzentrationen die erwarteten

stark positiven Reaktionen, so daß die Methode allen Anforderungen einer routinemäßigen Gonadotropinbestimmung auch in dieser Hinsicht entsprach.

Untersuchungen mit der halben Injektionsdosis zur Minderung der Versuchstiersterblichkeit

Da die Verluste an Tieren bei beiden Methoden im Durchschnitt 25% betrugen, diese Ausfälle aber nicht auf eine Toxizität der erhaltenen Verdünnungsreihen zurückzuführen waren, da keine Beziehungen zwischen der Zahl der jeweils ausgefallenen Tiere und etwa der Konzentrationshöhe der Verdünnungen festzustellen waren, konnte eher angenommen werden, daß die Belastung durch die im Verhältnis zur Größe des Tieres quantitativ großen Injektionsdosen von Tieren schwächerer Konstitution nicht überstanden wurde. Auf Grund dieser Überlegungen wurden Versuche mit der halben Injektionsdosis - also 0,25 ccm statt wie bisher üblich 0,5 ccm - unternommen. Die Konzentration der Verdünnungsreihen wurde im Interesse des genauen Ansatzes nicht geändert, da die Grundmengen an sich schon sehr gering sind und keine weiteren Einengungen mehr vertragen. Die Ergebnisse wurden also bei einer Verringerung der Injektionsdosis auf die Hälfte rein rechnerisch auf das Doppelte erhöht.

Es wurden Untersuchungen über die Mäusesterblichkeit und die eventuelle Empfindlichkeitsminderung bei Verwendung nur der halben Injektionsdosis mit 20 nach T a u - b e r t - W e l l e r aufbereiteten Versuchsurinen durchgeführt. Die gegenübergestellten 20 Kontrollversuche mit 0,5 bzw. 0,25 ccm ergaben eine geringe Empfindlichkeitsminderung von ca. 2,9 %, was bei der großen Toleranz biologischer Untersuchungsmethoden kaum von Bedeutung sein dürfte. Die Sterblichkeitsquote der Tiere

- bezogen auf die Gesamtzahl der verwendeten Mäuse pro Versuchsreihe - sank dafür aber erheblich von 26,25 % bei einer normalen Injektionsdosis von 0,5 ccm p.d. auf nur noch 11,2 % bei einer Dosis von 0,25 % p.d., wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist.

Tab. VIII

Injektionsmenge: 0,5 ccm p.d.			0,25 ccm p.d.	
Urin-Nr.	Ermittelte Mäuse-Einheiten	Anzahl der verendeten Tiere (von jeweils 8)	Ermittelte Mäuse-Einheiten	Anzahl der verendeten Tiere (v.jeweils 8)
1.	12	1	12	1
2.	18	1	18	-
3.	54	3	54	2
4.	12	2	12	1
5.	6	2	6	-
6.	24	3	18	1
7.	18	2	18	1
8.	12	1	18	-
9.	24	-	24	1
10.	54	2	54	-
11.	18	4	24	2
12.	24	2	24	2
13.	24	3	24	-
14.	12	1	12	-
15.	18	2	18	-
16.	12	3	12	1
17.	18	4	12	2
18.	24	1	24	1
19.	12	2	12	1
20.	18	3	24	2

Summarische Auswertung

Ges.-Zahlen:

414

42

402

18

Empfindlich-

keit in %:

100 %

97,1 %

Sterblichkeit

in %:

26,25 %

11,2 %

Da diese Modifikation infolge der notwendigen Beibehaltung der Verdünnungsreihen sich verständlicherweise nur auf normale wie erhöhte Gonadotropinwerte anwenden läßt, ergab sich die Notwendigkeit, für zu erwartende subnormale Gonadotropinmengen von vornherein die gesamte 24^h -Urinmenge zu verarbeiten, doch bedeutet dies bei der Adsorptionschromatographie nicht eine nennenswerte Mehrarbeit. Auf diese Weise stand als Endprodukt die doppelte Gonadotropinkonzentration zum Ansatz der Verdünnungsreihen zur Verfügung. Die Ergebnisse wichen auch hier in nur sehr geringem Maße von den oben angeführten Werten ab, so daß also auch für subnormale Werte die Modifikation mit der halben Injektionsdosis und ihre geringe Mäusesterblichkeitsquote in Anspruch genommen werden kann.

Für die exakte Dosierung der Injektionsmengen, auf die es bei den geringen Grundmengen zur Erzielung genauer Ergebnisse in erster Linie ankommt, wurden Tuberkulinspritzen verwendet.

Untersuchungen mit verkürzter Durchlaufzeit und Modifikation des Waschvorganges.

Da bei der Adsorptionschromatographie gegenüber der Methode nach K l i n e f e l t e r u. Mitarb., die im Durchschnitt 36 Stunden zur Durchführung erforderte, noch immer 20 Stunden erforderlich waren, wurden Wege gesucht, diese Zeit durch entsprechende Modifikation der Methode weiterhin um ein Beträchtliches zu verringern. Da vor allem die staubfeinen Anteile des Permutits, die häufig von der durchlaufenden Urinmenge an einer Stelle der Chromatographiesäule derart zusammengespült wurden, daß es trotz Anwendung der Wasserstrahlpumpe zu einer Beeinträchtigung des schnellen Durchlaufs und damit zu einer Behinderung der Adsorption kam, wurde das Permutit

vor Gebrauch in den Säulen entweder ausgeblasen oder durch Sieben in einem feinen Mullbeutelchen von den feinen Staubteilchen befreit. Restliche Staubanteile wurden dadurch beseitigt, daß sofort bei Einfüllen des Urins in den Vorratsbehälter am unteren Ende der Säule die Wasserstrahlpumpe angeschlossen wurde, bis die ersten ccm Urin dort austraten. Durch das in diesem Falle schnellere Vordringen des Urins in der Säule werden die sehr kleinen Restmengen des Permutitstaubes mitgerissen und mit den ersten Kubikzentimetern Urin aus der Säule gespült.

Auf Grund der beobachteten sehr unterschiedlichen Durchlaufzeiten des Urins durch die Säulen, die durch die feinen Bestandteile des Permutits hervorgerufen waren, wurden Untersuchungen durchgeführt, die den Einfluß der schnelleren Durchlaufgeschwindigkeiten auf die Aufnahmefähigkeit des Permutits prüfen sollten. Da bei normaler Versuchsanordnung die Durchlaufzeiten in der Regel zwischen 1 und 5 Stunden lagen, in den meisten Fällen allerdings mindestens 3 - 4 Stunden bestrugen, wurde versucht, die Durchlaufzeit durch Anschluß der Säulen an die Wasserstrahlpumpe zu verkürzen. Es wurde der Durchlauf etwa so reguliert, daß er in einer Stunde abgeschlossen war. Diese Zeit entsprach der unter den günstigsten Umständen beobachteten Durchlaufzeit.

Gleichzeitig wurde versucht, den Trocknungsprozeß des Präzipitats durch Modifikation der Waschungen wesentlich abzukürzen. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach gründlicher Zentrifugierung des Präzipitats und Dekantieren der überstehenden Flüssigkeit wurde der restliche Alkohol mit einem Stückchen Löschpapier abgesaugt. Auf die Waschung mit Alkohol und die anschließende zeitraubende Trocknung konnte dann verzichtet werden. Zur zuverlässigen Entfernung der Oestrogene aus dem Präzipitat

wurde dann zweimal mit Äther gewaschen. Die Waschung wurde sehr gründlich vorgenommen. Anschließend wurde zentrifugiert, dekantiert und im Exsiccator, der zur zuverlässigen Trocknung noch ein Glas konzentrierte Schwefelsäure enthielt, getrocknet.

Diese Modifikation wurde anhand von 20 Normalurinen in vergleichenden Untersuchungen der Methode nach T a u b e r t - W e l l e r gegenübergestellt. Die Ergebnisse können folgender Tabelle entnommen werden:

Tab. IX

Urin-Nr.	Methode T.-W.	Eigene Mod.
1.	24	18
2.	12	12
3.	24	24
4.	18	18
5.	12	12
6.	24	18
7.	12	12
8.	18	18
9.	24	18
10.	24	24
11.	18	18
12.	18	18
13.	24	18
14.	24	24
15.	18	18
16.	12	12
17.	18	12
18.	24	24
19.	18	18
20.	18	18

Summarische Auswertung:

Gesamtzahlen:	384	354
Empfindlichkeit in %:	100 %	92,2%

Untersuchungen mit einem Viertel der 24^h -
Urinmenge bei zu erwartenden hohen Gonado-
tropinwerten.

Um den technischen Aufwand zu verringern, wurde unter-
sucht, ob bei Verarbeitung nur eines Viertels der
 24^h -Urinmenge eine Beeinträchtigung der Empfindlichkeit
der Methode nach T a u b e r t - W e l l e r
resultiert.

Bei einer Durchschnitts- 24^h -Urinmenge von etwa einem
Liter und der Kapazität der Permutit-Säulen von 250 -
300 ccm wurde dadurch pro Versuch nur noch eine Säule
benötigt. Die Verarbeitung wurde nach dem oben angege-
benen Verfahren mit Verkürzung der Durchlaufzeit und
Modifikation des Waschungs- und Trocknungsvorganges vor-
genommen. Die biologische Auswertung erfolgte unter Ver-
ringerung der bei T a u b e r t - W e l l e r
angegebenen Injektionsdosis auf die Hälfte.

Diese Versuche wurden nur bei Urinen mit zu erwartenden
normalen oder erhöhten Gonadotropinwerten unternommen.
Die Ergebnisse ließen keine Änderung der Empfindlichkeit
erkennen, wie aus folgender Tabelle zu ersehen ist:

Tab. X

Urin-Nr.	1/2 24^h -Urinmenge	1/4 24^h -Urinmenge
1.	108 ME	108 ME
2.	108 "	108 "
3.	162 "	162 "
4.	216 "	216 "
5.	162 "	162 "
6.	216 "	216 "
7.	108 "	108 "
8.	216 "	216 "
9.	162 "	162 "
10.	108 "	108 "
11.	108 "	108 "
12.	162 "	162 "
13.	216 "	216 "
14.	216 "	216 "
15.	108 "	108 "

Diese Modifizierungen der Methode nach T a u b e r t - W e l l e r ließen also die Empfindlichkeit gegenüber der von den Autoren angegebenen Versuchsanordnung um 7,8% sinken. Sie lagen damit in Bezug auf Empfindlichkeit etwa zwischen der Klinefelterschen Methodik und der von T a u b e r t - W e l l e r. Dem steht gegenüber eine Zeitersparnis von ca. 40 - 60%, bezogen auf die Methode nach T a u b e r t - W e l l e r, auf die Methode nach K l i n e f e l t e r u. Mitarb. bezogen sogar von ca. 80%. Gleiche Werte ergaben sich auch bei Verarbeitung nur eines Viertels der 24^h-Urinmenge, wobei sich der technische Aufwand noch auf die Hälfte verringerte.

Selbsterstellung einer zweckmäßigen Chromatographiesäule

Bei all diesen Versuchen wurden anstelle der überaus empfindlichen und kostspieligen handelsüblichen Chromatographiesäulen für die eigenen Untersuchungen die erforderlichen Säulen auf einfachste Weise nach folgendem Verfahren selbst hergestellt, das sich im Laufe der Untersuchungen als sehr billig und zweckmäßig bewährte:

Benötigt werden pro Säule: 1 stabiles Glasrohr (G) mit einer lichten Weite von 1,2 cm und einer Länge von 650 mm, 2 ca. 8 cm lange Schlauchstücke (Sch), die sich über das Glasrohr schieben lassen, 1 käufliches Porzellan-siebplättchen (Sp), dessen Durchmesser gleich dem des Glasrohres sein muß, ein Glasröhrchen, dessen beide Enden man zu einer Schlaucholive (SO) geblasen hat, und ein Vorratsgefäß (V) von 350 ccm Fassungsvermögen.

Die beiden Schlauchstücke werden über die Enden des Glasrohres geschoben. In das untere Schlauchstück wird zum



Abb. 3

Abschluß der Säule ein Siebplättchen eingesetzt, das durch die nachgeschobene Schlaucholive am unteren Rand des Glasrohres gehalten wird. Das obere Schlauchstück verbindet dann das Glasrohr mit dem Vorratsgefäß, bzw. dem Scheidetrichter. Nach Füllung mit Permutit ist die Säule dann gebrauchsfertig. Das stabile Glasrohr der Säule läßt sich auch bei hart versetztem Permutit durch Abnehmen der Schlauchstücke und Durchstoßen mit einem durch Anschluß an die Wasserleitung gleichzeitig spülenden Glasröhrchen leicht reinigen.

UNTERSUCHUNGEN MIT DER EIGENEN MODIFIZIERTEN TECHNIK ZU DIAGNOSTISCHEN ZWECKEN

Eigene Technik

Auf Grund der vorhergehenden Untersuchungsergebnisse schien uns folgende Modifikation der Methode nach **T a u b e r t - W e l l e r** für die klinische Routineuntersuchung - besonders im Hinblick auf ihre technische und zeitliche Vereinfachung - besonders geeignet:

1/2 eines 24^h-Urins wird mittels Eisessig auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt. Dieser Ansatz wird durch

eine 60 cm lange Chromatographiesäule mit einer lichten Weite von 1,2 cm, die mit Permutit als Adsorbens gefüllt ist, geleitet. Sofort nach Füllung des Vorratsgefäßes oberhalb der Chromatographiesäule wird am unteren Ende derselben eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen, bis die ersten Tropfen Urin dort austreten. Dann wird der Sog der Wasserstrahlpumpe so eingeregelt, daß der Urin in schneller Tropfenfolge austritt und die gesamte Urinmenge in ca. 1 Stunde die Säule passiert hat. Anschließend wird das Permutit durch den starken Sog der Wasserstrahlpumpe getrocknet. Dann wird mit 60 ccm 35%-igem unvergälltem Alkohol, der 10% Ammonacetat enthält, die Säule eluiert. Das Eluat wird in 250 ccm fassenden Zentrifugengläsern aufgefangen und die Gonadotropine durch Erhöhung der Alkoholkonzentration - man füllt die Zentrifugengläser mit 96%-igem Äthylalkohol bis 250 ccm auf und beläßt sie 6 Stunden im Kühlschrank - ausgefällt. Anschließend wird das Präzipitat zentrifugiert (für 3 Min. bei 2 500 - 3 000 Umdr. pro Min.), so daß der Alkohol abgegossen werden kann. Die eventuell vorhandene Flüssigkeit wird mit einem Stückchen Löschpapier abgesaugt. Anschließend wird zur Entfernung der Oestrogene zweimal gründlich durch Zentrifugation mit Äther gewaschen. Schließlich wird zentrifugiert, dekantiert und im Exsiccator, der zur zuverlässigen Trocknung noch ein Glas konzentrierte Schwefelsäure enthält, getrocknet.

Am Tage vor dem Versuch wird das bei Zimmertemperatur für mehrere Tage haltbare trockene Pulver der Zahl der Versuchstiere entsprechend mit Aqua dest. resuspendiert und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am Tage darauf können die gewünschten Verdünnungsreihen hergestellt werden. Für die biologische Darstellung werden weiße weibliche Mäuse im Alter von ca. 17-21 Tagen an den ersten beiden Tagen je zweimal, am dritten Tag einmal mit jeweils 0,25 ccm der entsprechenden Verdünnung in-

jiziert. Am vierten Tage werden diese Tiere mit Leuchtgas getötet und die Uteri mit denen der Kontrolltiere verglichen. Dabei werden die freipräparierten Uteri zwischen Filterpapier getrocknet und gewogen. Gewichtserhöhungen über 7 mg gelten dabei als positives Ergebnis, wobei die Anzahl der Mäuse-Einheiten (ME) aus dem Verdünnungsquotienten berechnet wird.

Vergleichende Untersuchungen bei normalen Gonadotropinwerten.

Um die generelle Brauchbarkeit dieser Methodik nachzuweisen, war es außerdem noch erforderlich, dieses mit bisher bekannten Verfahren der Gonadotropinbestimmung zu vergleichen. Hierfür kamen insbesondere die Alkoholfällung-Dialyse-Methode nach K l i n e f e l t e r u. Mitarb. und die Adsorptionschromatographie nach T a u b e r t und W e l l e r in Betracht. Diese beiden Methoden wurden besonders in Hinsicht auf ihre Genauigkeit in vergleichenden Untersuchungen der eigenen modifizierten Technik gegenübergestellt. Die Summe der Ergebnisse der jeweiligen Versuchsreihe wurde in Prozenten ausgedrückt und mit denen der anderen Verfahren verglichen.

Zur Ermittlung der Normalwerte wurden die Urine von 20 gesunden Männern zwischen 25 und 35 Jahren zur Untersuchung herangezogen. Es wurden je 3 gesammelte 24^h-Urinmengen filtriert, gemischt und zu gleichen Teilen wieder aufgeteilt, so daß für jeden Versuch das gleiche Ausgangsmaterial zu Verfügung stand. Diese Urine wurden dann nach allen drei Methoden einer Untersuchung unterzogen. Die erhaltenen Werte schwankten in den auch in der Literatur als normal angesehenen Grenzen, zwischen 6 und 54 Mäuseeinheiten. Die Empfindlichkeitsunterschiede können folgender Tabelle der Versuchsergebnisse entnommen werden:

Tab. XI

Ermittelte Mäuse-Einheiten nach:

Versuch-Nr.	Klinef.	Taub.-Well.	Eig. Mod.
1.	19,8	24	24
2.	6,6	12	12
3.	19,8	24	18
4.	13,2	12	12
5.	52,8	54	54
6.	6,6	12	12
7.	19,8	18	18
8.	26,4	24	24
9.	13,2	18	12
10.	19,8	18	18
11.	19,8	24	24
12.	13,2	18	12
13.	52,8	54	54
14.	19,8	18	18
15.	6,6	12	12
16.	19,8	18	18
17.	13,2	12	12
18.	19,8	24	18
19.	26,4	24	24
20.	13,2	18	18

Summarische
Auswertung

Gesamtzahlen:	392,6	438,0	414,0
Empfindlichkeit in %:	89,5%	100 %	94,5%

Vergleichende Untersuchungen bei erhöhten Gonadotropinwerten

Zur Bestimmung erhöhter Gonadotropinwerte wurden in gleicher Weise nochmals 10 Verdünnungen von Schwangerenurinen untersucht. Nach den hier ermittelten Werten scheinen zur Bestimmung extrem hoher Gonadotropinkonzentrationen alle drei Methoden gleichermaßen geeignet zu sein, da infolge der extrem hohen Werte geringe Empfindlichkeitsunterschiede kaum von Bedeutung sind. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen zeigt folgende Tabelle:

Tab.XII

Ermittelte Mäuse-Einheiten nach:

Versuch-Nr.	Klinef.	Taub.-Well.	Eigene Modifikation
1.	845	864	864
2.	845	864	864
3.	1267	1296	1296
4.	845	864	864
5.	422	432	432
6.	845	864	864
7.	1267	1296	1296
8.	845	864	864
9.	845	864	864
10.	845	864	864

Vergleichende Untersuchungen mit Patienten - Urinen

Nachdem die eigene Modifikation der Gonadotropinbestimmung generell ihre Brauchbarkeit gegenüber den anderen Methoden bei Urinen mit voraussehbaren Ergebnissen erwiesen hatte, wurden zum Nachweis ihrer klinischen Verwertbarkeit 50 pathologische Urine einer vergleichenden Untersuchung mit den drei Methoden unterzogen, deren Ergebnisse, wie auch deren diagnostische Hinweise der nun folgenden Aufstellung zu entnehmen sind:

Tab. XIII

Ermittelte Mäuse-Einheiten nach:

Pat.Nr. Klin. T.u.W. Eig.Mod.

Anamnestiche und

diagnostische Hinweise

1	52,8	54	54	34 J., kinderlos verheiratet, Aspermie, regelrechtes Parenchymbild, wahrsch. Obstruktion der abführenden Samenwege durch Narbenbildung. 1944 Durchschuß rechter Hoden.
2	106	108	108	Kinderlos verheiratet, Tubuli teilweise geschädigt, Leydigzellen vermehrt.
3	52,8	54	54	Kinderlos verheiratet, Hoden normal, histol. kein pathol. Befund.
4	26,4	54	24	Aspermie, wahrscheinlich doppelseitige Verlegung der Samenwege durch frühere Go.
5	106	108	108	Azoospermie, Wanderhoden, schwere Tubulusschädigung, temperaturbedingte primäre Hodenschädigung.
6	106	108	108	Azoospermie, Wandschädigung der Tubuli, Leydigzellen gering vermehrt.
7	106	108	108	Azoospermie, rechter Hoden u. Nebenhoden wegen Tb. entfernt, Rö.-bestrahlt linker Hoden weiche Konsistenz, schwere Tubulusdegeneration.
8	106	108	108	Aspermie, Adipositas, Bartwuchs normal, Schambehaarung feminin, Hoden nicht nachweisbar, früher doppelseitige Hoden-Tb.

Ermittelte Mäuse-Einheiten nach:
Pat.Nr. Klin. T.u.W. Eig.Mod.

Anamnestiche und
diagnostische Hinweise

9	13,2	18	18	Hochgradige Oligospermie, verh., kinderlos, Testes u. histol.Befund normal.
10	26,4	18	12	Aspermie, kinderlos verh. Parenchymbild normal, kein Anhalt für hormonelle Ausfallerscheinungen.
11	106	216	108	Azoospermie, doppelseitige Hodenatrophie, Tubulus-schädigung, Leydigzellen schwach vermehrt, Klinefelter Syndr.?
12	106	108	108	Verh., kinderlos, Hoden verkleinert, Parenchymbild wenig verändert, Testes von weicher Konsistenz, Genese der Fertilitätsstörung unbekannt.
13	106	108	108	Azoospermie, Tubuli stark geschädigt, Zwischenzellwucherungen, Verdacht auf Hypergon. Hypo-gonadismus.
14	26,4	24	24	Aspermie, Tubuli normal, Hoden normal, Verdacht auf Verschuß der ableitenden Samenwege.
15	212	216	216	Tubulusschaden unbekannter Genese, Verdacht auf Hypergon. Hypogonadismus.
16	106	108	108	Azoospermie, schwere Tubulusdegeneration auf Grund einer Hoden-Tb., rechter Hoden entfernt.
17	212	216	216	Aspermie, wahrscheinlich Kryptorchismus, Testes im Scrotum nicht nachweisbar, schwacher Bartwuchs, Intelligenz mäßig.

Ermittelte Mäuse-Einheiten nach:

Pat.Nr. Klin. T.u.W. Eig.Mod.

Anamnestiche und

diagnostische Hinweise

18	26,4	24	54	Hochgradige Oligospermie Testes klein, Parenchym- bild normal, wahrschein- lich Ableitungsstörung.
19	52,8	54	24	Aspermie, doppelseitige Verlegung der ableitenden Samenwege durch Go.
20	52,8	108	54	Kinderlos verh., Hoden- befund normal, ev. pri- märer Hodenschaden.
21	106	54	108	Geringer Tubulusschaden, Reifestörungen unbekannter Genese.
22	106	108	108	Kinderlos verh., hochgra- dige Oligospermie, im Interstitium vermehrt Leydigzellen, Tubulusschä- digung.
23	52,8	108	54	Kinderlos verh., Testes no: Verdacht auf primären Hode: schaden, unsicher.
24	212	108	108	Adipositas, Bartwuchs normal, Schambehaarung feminin, früher Hoden-Tb., Kein Hoden nachweisbar.
25	212	216	216	Azoospermie, Zwischen- zellwucherungen, Tubulus- schädigung, Verdacht auf Hypergon. Hypogonadismus.
26	106	108	108	Aspermie, Wanderhoden, schwere Tubulusdegeneratio: Verdacht auf primären Hodenschaden auf Grund einer Temperaturstörung.

Ermittelte Mäuse-Einheiten nach:				Anamnestiche und
Pat.Nr.	Klin.	T.u.W.	Eig.Mod.	diagnostische Hinweise
27	106	108	108	Aspermie, doppelseitige Hodenatrophie, Tubulus-schädigung, Leydigzellen vermehrt. Verdacht auf Klinefelter Syndr.?
28	26,4	54	24	Aspermie, normaler histol. Befund, Verdacht auf Verschuß der ableitenden Samenwege.
29	212	216	216	Schwerer Tubulusschaden unbekannter Genese, Verdacht auf Hypergon. Hypogonadismus.
30	26,4	24	18	Aspermie, histol. Bild normal, narbenbedingter Verschuß der ableitenden Samenwege durch Kriegsverletzung.
31	106	108	108	Adipositas, feminine Schambehaarung, kein Hoden nachweisbar, Verdacht auf Hypergon. Hypogonadismus.
32	52,8	54	54	Verheiratet, Frau Fehlgeburt, Oligospermie, Testes klein, Parenchymbild fast normal.
33	52,8	54	54	Aspermie, Hodendurchschuß. Parenchymbild normal, Verschuß der ableitenden Samenwege.
34	106	216	108	Oligozoospermie, geringe Tubulusschäden, Zwischenzellwucherungen, Verdacht auf primären Hodenschaden.
35	106	108	108	Oligospermie, geringer Tubulusschaden, Spermatogenese verringert, Reifestörungen.

Ermittelte Mäuse-Einheiten nach:
Pat.Nr. Klin. T.u.W. Eig.Mod.

Anamnestiche und
diagnostische Hinweise

36	52,8	54	24	Aspermie, früher Go., Tubuli normal, Ver- schluß der ableitenden Samenwege auf Grund einer Go.
37	212	216	216	Hypogonadismus, hypergo- nadotroper, schwere Parenchymschädigungen unbekannter Genese.
38	106	108	108	Kinderlos verh., Testes von weicher Konsistenz, rechter Hoden verkleinert, Parenchymbild wenig ver- ändert, Fertilitätsstörung unbekannter Genese.
39	106	108	108	Verh., kinderlos, hoch- gradige Oligospermie, Tubulusschädigung mit interstitieller Zellver- mehrung.
40	106	108	108	Azoospermie, weiche Kon- sistenz des Hoden, Hoden- Tb. röntgenbestrahlt.
41	3,3	3	3	16 J., geistig zurück- geblieben, Hodenatrophie doppelseitig, fehlende Schambehaarung, körperlich unterentwickelt.
42	3,3	3	3	16 J., Zwillings, geistig zurückgeblieben, Hoden- atrophie doppelseitig, fehlende Schambehaarung, körperlich unterentwickelt.
43	3,3	3	3	40 J., kinderlos verh., Stammfettsucht, geringe Sekundärbehaarung, Tubu- lusdegeneration, Verdacht auf Hypophysen- schaden.

Ermittelte Mäuse-Einheiten nach:				Anamnestiche und diagnostische Hinweise
Pat.Nr.	Klin.	T.u.W.	Eig.Mod.	
44	6,6	6	6	Azoospermie, geringer Fettansatz am Stamm Tubulusschaden, Zwischenzellen vermindert, Testes kaum tastbar.
45	3,3	3	3	Azoospermie, 35 J., verh. kinderlos, Gynäkomastie, früher Beckenbruch, Tubulusdegeneration, selten Leydigzellen. Verdacht auf nerval bedingten Hypophysenschaden.
46	3,3	3	3	Verh., kinderlos, Azoospermie, Hodenatrophie doppelseitig, Gynäkomastie.
47	3,3	3	3	Kinderlos verh., eunuchoider Habitus, Verdacht auf Unterfunktion der Hypophyse.
48	6,6	6	6	34 J., verh. kinderlos, unterentwickelte Testes, geringe Tubulusschädigung, Leydigzellen vermindert, Verdacht auf Hypogon. Hypogonadismus.
49	6,6	6	6	Verzögerte Pubertät, doppelseitige Hodenatrophie, geistig und körperlich zurückgeblieben, Verdacht auf Störung der gonadotropen Partialfunktion der Hypophyse.
50	6,6	6	6	Hochgradige Oligospermie, früher Mumps, Testes normal, Verdacht auf beginnenden Morbus Cushing.

BESPRECHUNG DER EIGENEN UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigten in allen Fällen, daß die Empfindlichkeit der eigenen Modifikationen (94,5 %) nur unwesentlich der Methode nach T a u b e r t u. W e l l e r (100 %) nachsteht, hingegen noch über der der Alkoholfällung-Dialyse-Methode (89,5 %) liegt.

Bei Normal-Urinen wurden mit jeder der angewandten drei Methoden, die auch in der Literatur als physiologisch angesehenen Gonadotropin-Werte von 6 bis 54 ME ermittelt.

Versuche mit Schwangerenurinen bestätigen die Erwartung, daß diese Methode auch gegenüber extrem hohen Gonadotropinkonzentrationen über 1 000 Mäuseeinheiten nicht versagt.

Bei zu erwartenden erhöhten Gonadotropinwerten kann mit nur einem Viertel der 24^h-Urinmenge gearbeitet werden, ohne daß mit einer wesentlichen Empfindlichkeitseinbuße gerechnet werden muß, während es sich bei zu erwartenden subnormalen Werten als vorteilhaft für die Genauigkeit der Ergebnisse erwiesen hat, die gesamte 24^h-Urinmenge zur Verarbeitung zu bringen.

Die eigene Modifikation brachte besonders gegenüber der Alkoholfällung-Dialyse-Methode nach K l i n e f e l - t e r u. Mitarb. eine wesentliche Verringerung des technischen Aufwandes wie auch eine zeitliche Verkürzung der effektiven Arbeitszeit auf ca. 1/6. Verglichen mit der Adsorptionschromatographie nach T a u b e r t u. W e l l e r konnte zwar keine wesentliche Verringerung des technischen Aufwandes erreicht werden, die

effektive Arbeitszeit ließ sich aber auch hier auf ca. $1/4$ reduzieren.

Durch Verringerung der Injektionsdosis auf die Hälfte des bisher Üblichen, konnte die Sterblichkeit der Versuchstiere von ca. 26 % auf ca. 11 % gedrückt werden, ohne daß die Ergebnisse dadurch wesentlich beeinträchtigt wurden.

Verständlicherweise ist der Wert der hier vorstehend aufgezeigten eigenen Modifikation der chromatographischen Gonadotropinbestimmung erst dann mit Sicherheit abschließend zu beurteilen, wenn ihre Arbeitsweise wie auch die Ergebnisse auf einer weit breiteren Versuchsbasis als sie in der vorliegenden Arbeit möglich war, geprüft und erprobt worden sind.

Dennoch soll versucht werden, die Vor- und Nachteile der Methode, soweit sie in unseren Untersuchungen zu Tage traten, einer kritischen Betrachtung zu unterziehen.

Lag auch die Empfindlichkeit der eigenen Modifikation gering unter der der Methode nach T a u b e r t und W e l l e r , so war sie doch der Methode nach K l i n e f e l t e r u. Mitarb. in gleichem Maße überlegen. Ihre Empfindlichkeit liegt also im Durchschnitt durchaus in den Grenzen der zwei heute am häufigsten in der Klinik verwandten Methoden. Die geringen Empfindlichkeitsschwankungen stellen auch bei niedrigen Gonadotropinwerten keine Beeinträchtigung der diagnostischen Verwertbarkeit dar. Für die Diagnostik der erhöhten Gonadotropinausscheidungen hat sie verständlicherweise

überhaupt keine Bedeutung.

Dem steht gegenüber die wesentliche Verringerung des technischen Aufwandes und der Materialkosten, die besonders bei der Alkoholfällung-Dialyse-Methode sehr erheblich ins Gewicht fallen. Auch die Verkürzung der effektiven Arbeitszeit (die zur Präzipitation notwendigen Kühl- und Ruhezeiten wurden nicht gerechnet) auf $1/6$ bzw. $1/4$ scheint die Verwendung der Methodik in der klinischen Routineuntersuchung wesentlich zu erleichtern. Die Änderungen in der biologischen Testmethode lassen durch Verringerung des Versuchstierausfalles einen wesentlich sichereren Ausgang der Untersuchung erwarten, was die geringe Empfindlichkeitsminderung wohl kompensieren dürfte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die eigene Untersuchungsmethode in Bezug auf ihre Genauigkeit den bisher gebräuchlichen Methoden zumindest ebenbürtig zu sein scheint, im Hinblick auf ihre Durchführbarkeit jedoch einige nicht unerhebliche Vereinfachungen und Einsparungen bringt, die sie für die klinische Diagnostik auch auf breiterer Basis verwendbar erscheinen lassen.

Einen orientierenden Überblick über die wichtigsten Unterschiede und Eigenschaften der Methoden nach Taubert u. Weller, Klinefelter u. Mitarb. und der eigenen Modifizierung der Methode nach Taubert u. Weller gewährt die folgende Tabelle:

Tab. XIV

	Methode n. T.-W.	Methode n. Klin.	eigene Modifikation
Empfindlichkeit	100 %	89,5 %	94,5 %
Mäusesterblichkeit in % der Gesamttierzahl	26,25 %	26,25 %	11,2 %
Alkohol- verbrauch	500 ccm	5 000 ccm	500 ccm bzw. 250 ccm
Zeitaufwand	20 Std.	ca. 36 Std.	ca. 4-6 Std.
Techn. Aufwand	gering	erheblich	gering

ZUSAMMENFASSUNG

Nachdem Z o n d e k und A s c h h e i m 1927 der Nachweis einer schon früher vermuteten gegenseitigen Beeinflussung von Hypophyse und Sexualdrüsen gelungen war, konnten durch umfangreiche systematische Untersuchungen zahlreicher Autoren drei Hormongruppen als Hypophysen-Produkte isoliert werden: 1. das follikel-stimulierende Hormon, das beim Manne einen speziellen Effekt auf die Spermiogenese ausübt; 2. das Interstitialzellen-stimulierende Hormon, das den Aufbau des interstitiellen Gewebes und der Testosteronsynthese fördert, sowie 3. das Luteo-mammotrope Hormon, das zwar auch beim Mann stets nachweisbar ist, bisher aber nur bei der Frau in seiner Wirksamkeit geklärt werden konnte. Auf Grund des in weiteren Untersuchungen festgestellten sehr fein differenzierten Gleichgewichts zwischen Gonadotropinsekretion und Testosteronsynthese boten sich bei eintretenden Veränderungen dieses Gleichgewichtszustandes durch analysierende Rückschlüsse neue Möglichkeiten zur Diagnostik des Sitzes der auslösenden Störungen.

Voraussetzung dafür war, neben der Hodenbiopsie Methoden der quantitativen Bestimmung jeweils ausgeschütteter Hormonmengen unter Berücksichtigung ihrer normalen wie pathologischen Werte zu finden. Erstmals gaben K l i n e - f e l t e r und Mitarb. eine brauchbare Methode zur Erfassung gonadotroper Hormone aus dem Urin durch Alkohol-fällung-Dialyse an, die aber noch einen sehr umfangreichen zeitlichen und materiellen Aufwand erforderte. Ein Verfahren zur quantitativen Darstellung gonadotroper Hormone aus dem Urin durch Ultrafiltration nach v. M a s s e n - b a c h und v. E i c k s t e d t konnte sich ebenfalls wegen der dafür notwendigen komplizierten und kost-

spieligen Apparatur nicht als Routinemethode durchsetzen. Erst neuere Untersuchungen mit einer adsorbtionschromatographischen Methode nach T a u b e r t und W e l l e r ließen die Gonadotropinbestimmung aus dem Urin auch im Rahmen allgemeiner Laboratoriumsarbeit durchführbar erscheinen. Der Wunsch, die Gonadotropinbestimmung noch weiter zu vereinfachen, um sie auf breiterer Basis für die Diagnostik der Fertilitätsstörungen einsetzen zu können, veranlaßte die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen, in denen das Verfahren nach K l i n e f e l t e r und nach T a u b e r t u. W e l l e r unter Verwendung von Urinen gleichen Gonadotropingehaltes einander und einer vereinfachenden eigenen Modifikation der adsorbtionschromatographischen Methode gegenübergestellt wurden.

Die zunächst vorgenommenen Sensibilitätsvergleiche der beiden Original-Methoden ergaben, daß bei Anwendung der Adsorbtionschromatographie die ermittelten Gonadotropinwerte um etwa 12 % höher lagen als bei der Alkoholfällungs-Dialyse-Methode. Mit Schwangerenurinen durchgeführte Untersuchungen zeigten, daß das adsorbtionschromatographische Verfahren trotz seiner großen Empfindlichkeit auch bei extrem hohen Gonadotropinkonzentrationen verwendbar ist. Da der bei Durchführung der Original-Methoden auftretende Ausfall von durchschnittlich 25 % der erforderlichen Versuchstiere die quantitative Auswertung trotz der üblichen Paralleltestung an mehreren Tieren in Frage stellen kann, wurde untersucht, ob durch Verringerung der üblichen Injektionsdosis die Tiersterblichkeit ohne wesentliche Beeinträchtigung der Endresultate herabgesetzt werden kann. Es zeigte sich, daß eine um 15 % geringere Sterblichkeit bei einer für die Gesamtauswertung nur unerheblichen Empfindlichkeitsminderung von 2,9 % erzielt werden konnte. Um bei dieser Verfahrensweise auch noch subnormale Werte er-

fassen zu können, erwies es sich jedoch als notwendig, die gesamte 24^h -Urinmenge zur chemischen Aufschließung heranzuziehen. Durch weitere eigene Modifikationen (Steigerung der Durchlaufgeschwindigkeit durch die Chromatographie-Säulen und Abkürzung der Waschvorgänge) konnte der bei der adsorptionschromatographischen Methode an sich schon geringere Zeitaufwand gegenüber der Adsorptionschromatographie noch weiter verringert werden, ohne daß die Sensibilität der eigenen modifizierten Verfahren die Grenzen der diagnostischen Verwertbarkeit unterschritt. Bei zu erwartenden hohen Gonadotropinwerten konnte durch Verarbeitung nur eines Viertels der 24^h -Urinmenge eine 50 %-ige Reduzierung des technischen Aufwands erreicht werden, ohne daß die Genauigkeit der Ergebnisse im Vergleich zu denen der Original-Vorschriften beeinträchtigt wurden.

Auf Grund dieser in den jeweiligen Vorversuchen ermittelten Resultate wurden die einzelnen Modifikationen zusammengefaßt und in ihrer Gesamtheit für die von T a u - b e r t und W e l l e r angegebene Methode angewandt. Dieses modifizierte Verfahren wurde in vergleichenden Untersuchungen den Original-Methoden nach T a u - b e r t und W e l l e r sowie nach K l i n e - f e l t e r gegenübergestellt. Es zeigte sich, daß die Empfindlichkeit sowohl bei niedrigen als auch bei extrem hohen Gonadotropinkonzentrationen etwa zwischen der der beiden anderen Methoden lag. Die bei Normalurinen ermittelten Gonadotropin-Werte lagen - wie auch bei anderen in der Literatur angegebenen Verfahren - zwischen 6 und 54 Mäuseeinheiten. Bei zu erwartenden subnormalen Werten konnte ebenso wie in den Vorversuchen die gesamte 24^h -Urinmenge, bei zu erwartenden hohen Gonadotropinkonzentrationen nur $1/4$ der 24^h -Menge verarbeitet werden, ohne daß eine wesentliche Diskrepanz zwischen den Resultaten des

eigenen Verfahrens und der zum Vergleich herangezogenen Methoden zu beobachten war. Der Zeitgewinn bei der chemischen Aufarbeitung betrug gegenüber der Methode nach Taubert und Weller ca. 75 %, gegenüber der nach Klinefelter sogar 80 %. Durch das Absinken der Versuchstier-Sterblichkeit wurde indirekt auch eine größere Zuverlässigkeit bei der quantitativen Auswertung erreicht. Sollten die auch bei der Untersuchung von bisher 50 Patienten-Urinen mit pathologischen Gonadotropin-Werten ermittelten, gegenüber den bisherigen Methoden keine wesentlichen Abweichungen aufweisenden Ergebnisse sich auch an einem größeren Krankengut bestätigen lassen, dürften die technischen und finanziellen Vorteile des eigenen Verfahrens es für eine routinemäßige Anwendung in der Diagnostik männlicher Fertilitätsstörungen besonders geeignet erscheinen lassen.

Am Schluß der vorliegenden Arbeit möchte ich nicht versäumen, Herrn Professor Dr. med. H. Schuermann vielmals für die freundliche Überlassung des Themas zu danken.

Ebenso danke ich Herrn Dr. med. K. Gregorczyk für seine zahlreichen wertvollen Hinweise.

LITERATURVERZEICHNIS

- AARON, B.,
J. AARON,
J. MARESCAUX und
A. PETROWICH "Die quantitativen Verhältnisse
bei der Wirkung des HVL auf das
Ovar des Meerschweinchen."
Ann. d. Endocrin. 14, 500 (1953)
- ANSELMINO, K.J. und
F. HOFFMANN "Die Wirkstoffe des Hypophysen-
vorderlappens."
Handbuch der experimentellen
Pharmakologie. Bd. IX (Springer-
Verlag 1941)
- ASCHHEIM, S. "Hormone und Schwangerschaft."
Med. Klin. 1926, 2023
- ASCHNER, B. "Funktion der Hypophyse."
Arch.f.Physiol. 146, 1(1912)
- ASCHNER, B. "Beziehungen zwischen Hypophyse
und Genitale."
Arch.Gynäk. 97, 200(1912)
- BEDOYA, J.M. et
G.MORTIS "Gonadotropinbestimmung im Harn
bei drohendem Abort."
Acta gynäk.et obstetr.Hisp.
Lusit. 4, 97(1955)
- BELONOSCHKIN, B. "Zeugung beim Menschen im Lichte
der Spermatozoenlehre."
Sjöberg, Stockholm, 1949
- BOMSKOV, Chr. "Methodik der Hormonforschung."
2 Bde. Leipzig: Georg Thieme 1937
- BRADBURY, J.T.,
E.BROWN, and
W.F.BROWN "Adsorption of urinary gonadotrophin
of kaolin."
Federat. Proc. 8, 15 (1949)
- BRAZEL, E. "Eine Verbesserung des Schwanger-
schaftstests am Frosch durch
Prolanschnellfällung aus dem Harn."
Med.Welt 1951, 803
- CHANCE, M.R.A.,
I.W.ROWLANDS, and
F.G.YOUNG zit.nach G.WERTH
"Die gonadotropen Hormone."
Arzneimittel-Forsch. 5, 409, 735(1955)
6, 79(1956)

- CHOW, B.F.,
H.B. van DYKE,
R.O.GREEP,
A.ROTHEN, and
T.SHEDLOWSKI
"Gonadotrophins of swine pituitary;
preparation and biological and physico
chemical characterization of protein
apparently identical with metakentrin.
Endocrinology 30, 650(1942)
- CROOKE, A.C.,
W.R.BUTT,
I.D.INGRAM, and
L.E.ROMANSCHUCK
"Chemical Assay of Gonadotrophin in
Urine."
Lancet 20, 379 (1954)
- CUSHING, H.J.
zit.nach G.WERTH
"Die gonadotropen Hormone."
Arzneimittel-Forsch.5,409,735(1955)
6,79 (1956)
- DAHLBERG, B.
"Schwangerschaftsreaktion nach
Galli-Mainini mit Xenopuslaevis."
Nord.med.51,174 (1954)
- DEKANSKY, J.
"Kaolin-adsorption method for
quantitative assay of urinary
gonadotrophins."
Brit.J.exper.Path.30,272 (1949)
- EICKSTEDT, K.W.
"Experimentelle Untersuchungen
über die Nachweismöglichkeit gona-
dotroper Hormone mit Hilfe der
Ultrafiltration."
Dissertation Göttingen 1953
- ELFORD, W.J.
"The sizes of viruses and bacterio-
phages, and methods of their de-
termination."
In Handbuch der Virusforschung von
R.Doerr und C.Hallauer, Bd.I,
126, Wien 1938
- EVANS, H.M.,
R.J.PENCHARZ, and
M.E.SIMPSON
"On the conditions necessary for
the continous growth of hypophys-
ectomized animals."
Endocrinology 19, 509 (1934)
- EVANS, H.M., and
M.E.SIMPSON
"Physiology of the gonadotrophins."
Kap.IV in: The Hormones.
Herausgeg. von G. Pincus u. K.V.Thi-
mann, Bd.II,351,New York:Acad.
Press 1950

EVANS, H.M.,
M.E. SIMPSON,
S. TOLKSDORF, and
H.JENSEN

"Relation between the growth
promoting effects of the pitui-
tary and the thyroidhormone."
Endocrinology 25, 529 (1939)

FEVOLD, H.L.

zit. nach G. WERTH
"Die gonadotropen Hormone."
Arzneimittel-Forsch. 5, 409, 735
(1955)
6, 79 (1956)

FEVOLD, H.L.,
M. LEE,
F.L. HISAW, and
E. COHN

"Studies in physical chemistry
of anterior pituitary hormones:
separation of 5 anterior pitui-
tary hormones into different
fractions by isoelectric and
ammonium sulfate precipitation."
J. Endocrinology 26, 999 (1940)

FOLLEY, S.J., and
F.H. MALPRESS

"The Hormones", Bd. I
"Hormonal control of lactation."
Acad. Press Inc. Pub. N.Y. (1948)

FRAENKEL-CONRAT, H.

"Effect of thiols on reducing
groups of lactogenic hormone."
J. Biol. Chem. 142, 119 (1942)

FRAENKEL-CONRAT, H.,
CH.H. LI,
M.E. SIMPSON, and
H.M. EVANS

"Interstitialcell stimulating
hormone; biological properties."
Endocrinology 27, 793 (1940)

FRAENKEL-CONRAT, H.,
M.E. SIMPSON, and
H.M. EVANS

"Effect of thiol compounds on
gonadotrophins."
Science 91, 363 (1940)
"Purification of follicle stimu-
lating hormone of anterior
pituitary."
Ann. Facultad Med. Montevideo
25, 617 (1940)

GALLI-MAININI

"Also pregnancy test using male
toad."
J. clin. Endocrin. 7, 653 (1947)
"Reaccion diagnostica del embarazo
en la que se usa el sapo macho
como animal reactivo."
Semana med. I, 337 (1947)

- GORBMANN, A. "Ultrafiltration of urine for collection and biological assay of excreted hypophyseal hormones." *Endocrinology* 37, 177 (1945)
- GREEP, R.O.,
H.B. van DYKE, and
B.F. CHOW "Gonadotrophins on swine pituitary; various biological effects of purified thylenkentrin (FSH) and pure metakentrin (ICSH)." *Endocrinology* 30, 635 (1942)
Effects of digestion by proteolytic enzymes on gonadotrophic and thyrotrophic potency of anterior pituitary extract." *J. Endocrin.* 1, 440 (1940)
- HASENBEIN, G. "Über eine frühe Schwangerschaftsdiagnose mit Hilfe des Froschtestes." *Zbl. Gynäk.* 76, 552 (1954)
- HARTMAN, C.G., and
H. SPEERT "Action of progesteron on genital organs of unprimed rhesus monkey." *Endocrinology* 29, 639 (1941)
- HELLER, C.G., and
W.O. NELSON "Classification of male hypogonadism. A discussion of pathologic physiology diagnosis and treatment." *J. Clinical Endocrinol.* 8, 345 (1948)
- HOWARD, R.P.,
R.C. SNIFFEN,
F.A. SIMMONS, and
F. ALBRIGHT "Testicular deficiency: clinical and pathologic study." *J. Clin. Endocrinol.* 10, 121 (1950)
- KATZMAN, P.A.,
M. GODFRID,
C.K. CAIN, and
E.A. DOISY "Preparation of chorionic gonadotrophin by chromatographic adsorption." *J. biol. chem.* 148, 501 (1943)
- KLINFELTER, H.F.,
F. ALBRIGHT, and
G.C. GRISWOLD "Experience with a quantitative test for normal or decreased amounts of FSH in the urine in endocrinological diagnosis." *J. Clin. Endocrin.* 3, 529 (1943)
- LEVIN, L., and
H.N. TYNDALE "The quantitative assay of follicle stimulating substances." *Endocrinology* 21, 619 (1937)

- LI, CH.H.
"Studies on pituitary lactogenic hormone; diffusion and viscosity measurements."
J. Biol. Chem. 146, 633 (1943)
"Studies on pituitary lactogenic hormone; content of sulfur amino acid."
J. Biol. Chem. 148, 289 (1943)
- LI, CH.H., and
J.I. HARRIS
"Electrodialysis of sheep adreno-corticotrophic (ACTH) protein preparation."
Ann. Rev. Biochem. 21, 603 (1952)
- LI, CH.H.,
W.R. LYONS, and
H.M. EVANS
"Studies on pituitary lactogenic hormone; electrophoretic behavior."
J. gen. Physiol. 23, 433 (1940)
"Studies on pituitary lactogenic hormone; comparison of electrophoretic behavior of lactogenic hormone as prepared from beef and from sheep pituitaries."
J. Am. Chem. Soc. 62, 2925 (1940)
"Studies on pituitary lactogenic hormone; solubilities of sheep and beef hormones."
J. gen. Physiol. 24, 303 (1941)
"Studies on pituitary lactogenic hormone; molecular weight of pure hormone."
J. biol. Chem. 140, 43 (1941)
"Studies on pituitary lactogenic hormone; reactions with iodine."
J. biol. Chem. 139, 43 (1941)
"Electrophoretic study of lactogenic hormone."
Science 90, 530 (1940)
- LI, CH.H., and
K.O. PEDERSEN
zit. nach G. WERTH
"Die gonadotropen Hormone."
Arzneimittel-Forsch. 5, 409, 735 (1955)
6, 79 (1956)
- LI, CH.H.,
M.E. SIMPSON, and
H.M. EVANS
"Influence of growth and adreno-corticotrophic hormones of fat content of liver."
Arch. Biochem. 23, 51 (1949)

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- AARON, B.,
J. AARON,
J. MARESCAUX und
A. PETROWICH "Die quantitativen Verhältnisse
bei der Wirkung des HVL auf das
Ovar des Meerschweinchen."
Ann. d. Endocrin. 14, 500 (1953)
- ANSELMINO, K.J. und
F. HOFFMANN "Die Wirkstoffe des Hypophysen-
vorderlappens."
Handbuch der experimentellen
Pharmakologie. Bd. IX (Springer-
Verlag 1941)
- ASCHHEIM, S. "Hormone und Schwangerschaft."
Med. Klin. 1926, 2023
- ASCHNER, B. "Funktion der Hypophyse."
Arch.f.Physiol. 146, 1 (1912)
- ASCHNER, B. "Beziehungen zwischen Hypophyse
und Genitale."
Arch.Gynäk. 97, 200 (1912)
- BEDOYA, J.M. et
G.MORTIS "Gonadotropinbestimmung im Harn
bei drohendem Abort."
Acta gynäk.et obstetr.Hisp.
Lusit. 4, 97 (1955)
- BELONOSCHKIN, B. "Zeugung beim Menschen im Lichte
der Spermatozoenlehre."
Sjöberg, Stockholm, 1949
- BOMSKOV, Chr. "Methodik der Hormonforschung."
2 Bde. Leipzig: Georg Thieme 1937
- BRADBURY, J.T.,
E.BROWN, and
W.E.BROWN "Adsorption of urinary gonadotrophin
of kaolin."
Federat. Proc. 8, 15 (1949)
- BRAZEL, E. "Eine Verbesserung des Schwanger-
schaftstests am Frosch durch
Prolanschnellfällung aus dem Harn."
Med.Welt 1951, 803
- CHANCE, M.R.A.,
I.W.ROWLANDS, and
F.G.YOUNG zit.nach G.WERTH
"Die gonadotropen Hormone."
Arzneimittel-Forsch. 5, 409, 735 (1955)
6, 79 (1956)

Chromatographische Gonadotropingewinnung nach Taubert u. Weller

Aufbauend auf den Arbeiten von Katzman, Godfrid, Cain und Doisy, die zum erstenmal die Adsorptionschromatographie zur Darstellung und Gewinnung von Choriongonadotropin anwandten, und die auf die hypophysären Gonadotropine erweiterten Untersuchungen von Dekansky sowie Bradbury, Brown und Brown, die Kaolin als Adsorbens benutzten, und ferner Malburg und Goodman, die mit Aluminiumhydroxyd arbeiteten, entwickelten Taubert und Weller eine Methode der Gewinnung hypophysärer Gonadotropine durch die chromatographische Adsorption an Permutit. Dabei wurde folgende Methodik angewandt:

Zur Aufarbeitung gelangt die halbe 24^h -Urinmenge, die mittels Eisessig auf einen p_H -Wert von 4,0 eingestellt wird. Dieser Ansatz wird durch 60 cm lange Chromatographiesäulen geleitet, die eine lichte Weite von 1,2 cm haben und mit Permutit als Adsorbens gefüllt sind. Um einen kontinuierlichen Durchfluß zu gewährleisten, läßt man den Urinansatz aus Scheidetrichtern zufließen, wobei sich das Nachfließen durch Senken des Flüssigkeitsspiegels automatisch reguliert. Jede Säule hat eine Kapazität von 250 - 300 ccm Urin. Nach Passage des Urins wird das Permutit durch Anschluß der Säule an die Wasserstrahlpumpe getrocknet. Anschließend wird mit je 60 ccm 35%-igem unverg. Alkohol, der 10 % Ammonacetat enthält, jede Säule eluiert. Eine vorherige Waschung zur Entfernung toxischer Substanzen ist nicht mehr notwendig. Das Eluat wird in 250 ccm fassenden Zentrifugengläsern aufgefangen und die Gonadotropine durch Erhöhung der Alkoholkonzentration - man füllt die Zentrifugengläser mit 96 %-igem Äthylalkohol bis 250 ccm auf und beläßt sie 6 Stunden im Kühlschrank - ausgefällt. Durch anschließendes Zentrifugieren (für 3 min

SIMPSON, M.E.,
H.M. EVANS, and
CH.H. LI

"Bioassay of adrenocorticotrophic hormone."

J. Physic. chem. 33, 261 (1943)

"Biological properties of pituitary interstitial cell stimulating hormone (ICSH)."

Endocrinology 30, 969 (1942)

"Comparison of methods for standardization of pituitary interstitial cell stimulin hormone (ICSH)."

Endocrinology 30, 977 (1942)

"Sensitivity of reproductive system of hypophysectomized 40 day male rats to gonadotrophic substances."

Endocrinology 35, 96 (1944)

"Synergism between pituitary follicle stimulating hormone (FSH) and human chorionic gonadotropin."

Endocrinology 48, 370 (1951)

SMITH, P.E.

"Hastening development of female genital system by daily homoeoplastic pituitary transplants."

Proc. soc. exper. Biol. med.

24, 131 (1927)

"Genital system responses to daily pituitary transplants."

Proc. soc. exper. Biol. med.

26, 337 (1930)

SPATZ, H.

"Neues über Verknüpfung von Hypophyse und Hypothalamus. Mit besonderer Berücksichtigung der Regulation sexueller Leistungen."

Acta neuroveget. 3, 5 (1951)

STEELMAN, S.L., and
F.M. POHLEY

"Bestimmung des FSH auf Grundlage einer Wirkungsverstärkung mit menschlichem Choriongonadotropin."

Endocrinology 53, 604 (1954)

STEVE, H.

"Der Einfluß des Nervensystems auf Bau u. Tätigkeit der Geschlechtsorgane des Menschen."

Thieme, Stuttgart 1952

STRICKER, P. et
F. GRUETER

zit. nach G. WERTH

"Die gonadotropen Hormone."

Arzneimittel-Forsch. 5, 409, 735 (1955)

6, 79 (1956)

- TAUBERT, M. "Über die hypophysären Gonadotropine und die Bedeutung ihrer Bestimmung für die Diagnostik endokriner Störungen." Die Medizinische 17, 649 (1956)
- TAUBERT, M. und O. WELLER "Chromatographische Gonadotropin-gewinnung." Klin. Wochenschr. 34, 3/4, 84 (1956)
- VINCKE, E. "Die Gonadotropine." 1. Symposium der deutschen Gesellschaft für Endokrinologie. Verhandlungen. Springer-Verlag, Göttingen 1955
- WERTH, G. "Die gonadotropen Hormone." Arzneimittel-Forsch. 5, 409, 735 (1955)
6, 79 (1956)
- WHITE, A. Ann. Acad. Sci. N.Y. 43, 341 (1943)
- WHITE, A.
R.W. BONSNES, and
C.N.H. LONG "Prolactin." J. biol. Chem. 143, 447 (1942)
- WIESNER, B.P., and
P.G. MARSHALL "The gonadotropic hormones (p-Factors). I. The preparation and properties of extracts of anterior lobe, placenta and pregnancy urine." Quarterly J. of Exper. Physiol. Vol. XXI No. 2 1931
- WITSCHI, E. "Quantitative determination of follicle stimulating and luteinizing hormones in mammalian pituitaries and discussion of gonadotropic quotient." Endocrinology 27, 437 (1940)
- ZONDEK, B. "Die Hormone des Ovars und des Hypophysenvorderlappens." Wien 1935
"Hormone des Ovariums und des Hypophysenvorderlappens." 2. Auflage S. 171
Wien, Julius Springer 1935

ZONDEK, B.

"Über die Hormone des HVL.
IV. Darstellung des Follikelreifungs-
hormons (Prolan A). Methodik der
klinischen Harnanalyse zum Nachweis
des Prolan."

Klin. Wochenschr. 91, 1207 (1930)

ZONDEK, B. und
S. ASCHHEIM

"Ovarialhormon, Wachstum der Geni-
talien, sexuelle Frühreife."

Deutsch. med. Wschr. 1926, 343

"Hypophysenvorderlappen u. Ovarium"

Arch. Gynäk. 1, 1 (1927)

"Hormone des Hypophysenvorderlappens."

Klin. Wschr. 1927, 248

"Hypophysenvorderlappenhormone und
Ovarialhormone im Harn von Schwan-
geren."

Klin. Wschr. 1927, 1322

ZONDEK, B.,
H. SCHEIBLER und
W. KRABBE

"Zur Reindarstellung des gonadotro-
pen Hormons (Prolan)."

Biochem. Z. 258, 112 (1933)

ZONDEK, B. and
F. SULMAN

"The mechanism of action and meta-
bolism of gonadotropic hormones in
the organism."

In: Vitamins and Hormones Bd. III,
297, herausgegeben von R.S. Harris
und K.V. Thimann, New York:

Acad. Press 1945

Lebenslauf

Am 7. Juni 1928 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Dr. med. dent. Ludwig Schirow und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Arnold, in Magdeburg geboren. Die Volksschule besuchte ich von 1934 bis 1938 in Magdeburg und trat anschließend in das Staatl. vereinigte Dom- und Kloostergymnasium zu Magdeburg ein. Nach 1 1/4-jähriger Dienstzeit in der Wehrmacht und 1 1/2 Jahren amerikanischer und französischer Kriegsgefangenschaft setzte ich 1946 meinen Schulbesuch fort, den ich im April 1948 mit dem Abitur in Magdeburg beendete.

Nach 2-jähriger Tätigkeit in einem gewerblichen zahntechnischen Labor sowie im praxiseigenen Labor meines Vaters begann ich im Mai 1950 das Studium der Zahnmedizin an der Universität Würzburg. Im Juli 1952 legte ich die zahnärztliche Vorprüfung und im Sommer 1955 die zahnärztliche Prüfung an der Universität Würzburg nach 5 klinischen Semestern ab.

Bis Mai 1957 arbeitete ich am experimentellen Teil der vorliegenden Dissertation. Seitdem bin ich als Assistent in einer zahnärztlichen Praxis in Würzburg tätig.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Hans-S. Schirow

